



**FACULDADE DE CIENCIAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
ALIMENTACIÓN**

**INMOVILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE
ENDOXILANASAS DE *TRICHODERMA REESEI*.
PRODUCCIÓN DE XILO-OLIGOSACARIDOS POR
HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE XILANO.**

TESIS DOCTORAL.

Sandro Martins de Oliveira.

MADRID, Diciembre de 2017.

SANDRO MARTINS DE OLIVEIRA



**INMOVILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE
ENDOXILANASAS DE *TRICHODERMA REESEI*.
PRODUCCIÓN DE XILO-OLIGOSACARIDOS POR
HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE XILANO.**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid**

**DIRECTORES:
JOSÉ MANUEL GUISÁN SEIJÁS
SONIA MORENO PÉREZ
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica
C.S.I.C., Madrid**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**Facultad de Ciencias
Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación**

Madrid, 2017

**A mis padres, João e Joana, a mis hermanos,
Sídney y Simone, y a mi sobrino Arthur.**

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera expresar mis más profundos y sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que han hecho posible que la realización de esta Tesis Doctoral sea una realidad:

Ante todo, a Dios.

A José Manuel Guisán, director de esta Tesis, por todo su apoyo y entusiasmo, por compartir todos sus conocimientos científicos y su filosofía de vida, por su visión siempre positiva ante cualquier resultado bueno o malo, por tantas horas de dedicación. Por permitirme formar parte de su grupo de investigación durante todos estos años. Por creer en mí. Sin su incalculable ayuda y paciencia esta Tesis no hubiera sido posible.

A Sonia Moreno Pérez, co-directora de esta Tesis, por su ayuda, enseñanzas y horas de dedicación en estos últimos años que han supuesto un impulso final, imprescindible y definitivo, para terminar de dar forma a este trabajo. Además de co-directora, eres una gran amiga. ¡Gracias!

A Carlos Torres, tutor de la presente Tesis Doctoral, por toda su ayuda, disponibilidad y colaboración.

A Tiziana Fornari, directora del Instituto de Ciencias y Alimentación (CIAL) y coordinadora del Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación, por todo el apoyo y ayuda durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A Jose Carlos Conesa, director del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP), por toda la facilidad prestada durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Al personal de ambos centros (ICP y CIAL) (Mantenimiento, Almacén, Secretaría, Unidad de Apoyo, Limpieza, etc.) por su colaboración en el día a día.

Al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq) y al Ministerio de Ciencia, Tecnología, Innovaciones y Comunicaciones, ambas instituciones de Brasil, por la ayuda financiera prestada a través del Programa Ciencias sin Fronteras.

A Mari Carmen Ceinos, Roberto Munilla, Benevides Pessela y Gloria Fernandes por toda la ayuda en el laboratorio y los buenos momentos compartidos juntos.

A Marcelo Fernandes, por darme la oportunidad de iniciarme en el maravilloso e impredecible mundo de la investigación.

A todos mis compañeros de laboratorio, a “equipo xilanasos” y a los amigos de ICP: Lara, Maria, Alejandro, Janaina, Javier, Rita, Chiara, Cristina, Fernando y Asier. Gracias a todos por vuestro cariño y hacer que el día a día haya sido tan grato. Y muchísimas gracias por no olvidarse de mí incluso, después de todo el primer año sin hablar con nadie. Sois increíbles. Una verdadera familia que me ha regalado el doctorado. Os quiero muchísimo. A todos los compañeros y amigos que han pasado por el laboratorio y por mi vida en Madrid, desde los primeros (Los “sindicalistas” César, Daiane, Diogo, Kamilly y Michele (Benhê)) hasta los últimos (Gonzalo, Patri, Erik, Juliana, Malena, Paz y Paula). A Paloma por recibirme siempre con tanto amor y cariño en su casa, en su familia. Gracias a todos por los buenos momentos vividos.

A todos mis amigos de Brasil (Bea, Evandro, Deia, Juliana, Marcielly, Huenddi, Deisy, Laura, Diow, Fabricio, Túlio, Lucas, Vilany, Malaggi, Priscila Fernando, Flavio, Lais, Herithon, Gilliana, Uilian y Elena) y de los grupos de whatsapp: “Informações do vale”, “Purgatório lixo - o pior”, “Vale do Ivaí”, “Fusca 1987”, “LPS vintage”, “Turma da Catequese”. Em especia a mi gran amiga Vanessa Formentini (*in memoriam*). Muchísimas gracias a todos vosotros.

A toda mi familia por su total confianza, cariño y apoyo, en especial a mis padrinos Sirleni y Celio, y mis primos Ariane, Pedro, Sueli y Jordi.

Agradezco, sobre todo, con todo mi corazón, a mis padres, João e Joana, a mis hermanos, Sidney y Simone, a mi abuela, Ubaldina, y a mi sobrino Arthur. Cada día que pasa os quiero con más fuerza y siento la necesidad de teneros cerca. Gracias por estar junto a mí siempre y haberme apoyado en todo momento. No sabéis lo que significa para mí todos estos años de cariño. Os quiero hoy y siempre.

Si estoy aquí hoy, es porque tengo todos vosotros en mí vida.

Gracias a todos por todo.

"El correr de la vida lo envuelve todo.

La vida es así: se calienta y se refresca, se aprieta y se afloja, sostiene y luego desinquieta. Lo que ella quiere de nosotros es coraje ".

(Guimarães Rosa).

"Es un buen ejercicio para un investigador deshacerse de una hipótesis favorita todos los días, antes del desayuno. Eso lo mantendrá joven".

(Konrad Lorenz).

RESUMEN.

Las xilanasas son glucosidasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces 1,4- β -glucosídicos (endo-1,4- β -xilanasas) del xilano y que poseen potencial biotecnológico en varios procesos industriales. Recientemente, han tomado especial relevancia debido a su uso para la producción de los xilo-oligosacáridos (XOS) como ingredientes prebióticos. A pesar del uso de biocatalizadores poseer varias ventajas sobre los métodos químicos, su empleo generalmente es limitado para uso industrial debido principalmente a dos grandes factores: su dificultad de ser reciclado y su limitada estabilidad operacional. La inmovilización en soportes sólidos tal vez sea la estrategia preferida y más utilizada para solucionar las desventajas anteriores. Mejorar las propiedades catalíticas de las enzimas, modificando física o químicamente su superficie después del proceso de inmovilización (post-inmovilización), es una forma de optimizar el biocatalizador inmovilizado y tiene un enorme potencial. Así, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue el diseño de biocatalizadores muy eficientes de xilanasas para optimizar la producción de xilo-oligosacáridos. Las enzimas D333MDP y Bioxilanasas fueron inmovilizadas por unión covalente multipuntual en condiciones alcalinas, resultando en derivados con 0,718 y 7,83 mg de proteína/g soporte, respectivamente. La Bioxilanasas también fue inmovilizada en soporte de bajo costo, resultando en un derivado con 7.65 mg de proteína/g soporte. Modificaciones físico-químicas con polímeros viscosos fueron realizadas en los derivados, logrando biocatalizadores hasta 380 veces más estables que las enzimas solubles. Los biocatalizadores modificados mostraron una mayor eficiencia en la reacción de hidrólisis de xilano presente en la madera de haya y xilano de maíz, resultando reacciones hasta 5 veces más rápidas y más eficiente en producción de XOS que con los biocatalizadores inmovilizados no

modificados, logrando realizar seguidos ciclos de reacción de hidrólisis de xilano, alcanzando 90-100% de conversión a pH 5 50° C. Las enzimas estudiadas fueron inmovilizadas y estabilizadas con éxito, generando catalizadores propicios para la economía, con un alto grado de eficiencia y con una producción sostenible de xilo-oligosacáridos en los diferentes sectores industriales. Fue posible obtener un biocatalizador capaz de ser estable y reutilizable en las reacciones de hidrólisis de xilano, manteniendo la misma eficiencia de la reacción inicial en las reacciones sub-siguientes.

ABSTRACT.

Xylanases are glucosidases that catalyze the hydrolysis of xylan 1,4- β -glucosidic bonds (endo-1,4- β -xylanase) and have a biotechnological potential in several industrial processes. They recently received attention for their role on the production of xylooligosaccharides (XOS) as prebiotic ingredients. Despite having several advantages over chemical methods, enzymes are generally limited on industrial applications due mainly to two major factors: their difficulty in being recycled and their limited operational stability. Immobilization on solid supports may be the preferred and most commonly used strategy to solve these disadvantages. Improving the catalytic properties of the enzymes, by physically or chemically modifying their surface after the immobilization process (post-immobilization), is a way to optimize the immobilized biocatalyst and has an enormous potential. Thus, the main objective of this Doctoral Thesis was the design of highly efficient xylanase biocatalysts to optimize the production of xylooligosaccharides. The enzymes D333MDP and Bioxylanase were immobilized by covalent multipunctual binding under alkaline conditions, resulting in derivatives with 0.718 and 7.83 mg of protein / support, respectively. BIO was also immobilized on low cost support, resulting in a derivative with 7.65 mg of protein / g support. Physical-chemical modifications with viscous polymers were carried out on the derivatives, achieving biocatalysts up to 380 times more stable than soluble enzymes. The modified biocatalysts showed a higher efficiency in the xylan hydrolysis reaction of beechwood and corn xylan, resulting in reactions up to 5 times faster and more efficient in the production of XOS than those with the unmodified immobilized biocatalyst. Several consecutive cycles of hydrolysis reaction of xylan were achieved, reaching 90-100% conversion to pH 5, 50°C. The enzymes studied were

successfully immobilized and stabilized, generating catalysts economically profitable, efficient and sustainable production of xylooligosaccharides in the different industrial sectors. It was possible to produce a biocatalyst capable of being stable and reusable in xylan conversion while maintaining the same efficiency of the initial reaction in the following reactions.

ABREVIATURAS.

Ag-G: Agarosa activada con grupos glioxil.

AMN: Aminado.

AR: Azúcar reductor.

BCA: Método de determinación de proteína con ácido bicinchoninico.

BCL: Beads crosslinked (perlas reticuladas).

BIO: Enzima Bioxilanas.

BSA: Albúmina de Suero Bovino.

Cel-G: Celulosa activada con grupos glioxil.

CNBr ó BrCN: Agarosa activada con grupos de bromuro de cianógeno.

D333MDP: Enzima Depol™ 333MDP.

DNS: Ácido dinitrosalicílico.

Dx: Dextrano.

EDA: Etilediamina.

EDAC: Etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimina.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

FOS Fructooligosacárido.

GalOS: Galactooligosacárido.

Kda: Kilodaltons.

LCM: Material Lignocelulosico.

MC: Multicapa.

MW o PM: Molecular weight, es decir, peso molecular.

PEG o PEG-NH₂: Metoxipolietilenoglicol amino.

PEI: Polietilenimina.

PNPb: p-nitrofenil β -xilanopiranósido.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico).

XOS: Xilo-oligosacáridos.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Biomasa Lignocelulósica.....	10
1.2 Pared celular vegetal.....	11
1.2.1 Celulosa.....	12
1.2.2 Lignina.....	13
1.2.3 Hemicelulosa.....	15
1.3 Xilano.....	17
1.4 Xilanasas.....	20
1.5 Principales aplicaciones de las xilanasas.....	21
1.6 Fuentes y producción de xilanasas.....	25
1.7 Estabilidad de las xilanasas.....	27
1.8 Xilo-oligosacáridos.....	29
1.8.1 Como ingredientes prebióticos.....	29
1.9 Uso de las enzimas en las industrias.....	31
1.10 Biocatálisis.....	36
1.10.1 Inmovilización de enzimas.....	36
1.10.1.1 Inmovilización en soportes.....	37
1.10.1.2 Inmovilización reversible.....	38
1.10.1.3 Inmovilización irreversible o covalente.....	38
1.10.1.3.1 Unipuntual sobre soportes activados con grupos bromocianógeno-agarosa (CNBr).....	39
1.10.1.3.2 Multipuntual sobre soporte activados con grupos glioxil. 40	
1.10.2 Técnicas post-inmovilización de la superficie del catalizador inmovilizado.....	42
1.10.2.1 Modificación Química.....	43
1.10.2.1.1 Aminoetilamidación química de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA).....	44
1.10.2.2 Modificación físico-química.....	45
1.11 Reacciones enzimáticas para la obtención de xilo-oligosacáridos....	46

2	OBJETIVOS.	49
2.1	Objetivo general.	49
2.2	Objetivos específicos.	50
3	MATERIALES.	52
4	MÉTODOS.	54
4.1	Análisis de proteínas.	54
4.1.1	Preparación de enzimas para su estudio.	54
4.1.2	Cuantificación de la concentración proteica.	54
4.1.3	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	55
4.1.4	Análisis proteómico.	55
4.1.4.1	Digestión en gel (gel de apilamiento).	55
4.1.4.2	Cromatografía líquida de fase inversa Análisis RP-LC-MS / MS (modo de exclusión dinámica).	56
4.2	Determinación de la actividad xilanolítica.	56
4.2.1	Actividad endoxilanasas.	56
4.2.2	Actividad exoxilanasas.	58
4.2.3	Actividad específica.	58
4.3	Preparación de los soportes de inmovilización.	59
4.3.1	CNBr.	59
4.3.2	Glioxil-agarosa 10 BCL.	59
4.3.3	Glioxil-Celulosa.	61
4.4	Inmovilización enzimática.	61
4.4.1	Inmovilización covalente.	62
4.4.1.1	Unipuntual sobre soporte agarosa activados con grupos bromuro de cianógeno (CNBr).	62
4.4.1.2	Multipuntual sobre soporte agarosa y celulosa activados con grupos glioxil.	62
4.5	Modificación físico-química de las enzimas inmovilizadas.	63
4.5.1	Aminación química (AMN).	63
4.5.2	Modificación con polímeros viscosos.	63

4.5.2.1	Polietilenimina (PEI).	63
4.5.2.2	Dextrano (Dx).	64
4.5.2.3	Metoxipolietilenglicol amino 2000Da (PEG).	64
4.6	Estabilidad térmica de las enzimas inmovilizadas y modificadas.	65
4.7	Reacciones enzimáticas catalizadas por xilanasa.....	65
4.7.1	Hidrólisis enzimática de xilano.	65
4.8	Reutilización de los biocatalizadores.	66
4.9	Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento acoplado con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).....	66
4.9.1	Análisis de los resultados.	66
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	67
5.1	Caracterización de endoxilasas comerciales.....	67
5.1.1	Endoxilasa comercial Depol™ 333MDP (D333MDP) y Bioxilasa L Plus (Bioxilasa).	67
5.2	Estudio de la inmovilización-estabilización de la endoxilasa comercial D333MDP.....	69
5.2.1	Soporte CNBr.....	69
5.2.2	Soporte agarosa 10 BCL activada con grupos glioxil.	69
5.2.3	Estabilización de la xilanasa comercial D333MDP.	71
5.2.4	Aminación química de la superficie de la enzima D333MDP inmovilizada en soporte glioxil-agarosa.....	74
5.2.5	Reacción de Hidrolisis de xilano de haya para obtención de XOS. 76	
5.2.6	Reutilización de los biocatalizadores. Ciclo de reacciones.....	78
5.2.7	Análisis de los XOS producidos en la reacción de hidrolisis de xilano de haya.	79
5.2.8	Conclusión.	80
5.3	Estudio de la inmovilización-estabilización de la endoxilasa comercial bioxilasa.	82
5.3.1	Soporte CNBr.....	82
5.3.2	Soporte glioxil-agarosa.....	82
5.3.3	Estabilización de la xilanasa comercial Bioxilasa L Plus.....	83

5.3.4	Aminación química de la superficie de la enzima bioxilanasas inmovilizada en soporte glioxil-agarosa.....	86
5.3.5	Efecto de la modificación físico-química de la enzima inmovilizada con polímeros viscosos.	87
5.3.5.1	Efecto de la adición de una capa de Polietilenimina.....	88
5.3.5.2	Efecto de la adición de una capa de dextrano.	89
5.3.5.3	Efecto de la adición de una capa de metoxipolietilenglicol.	92
5.3.6	Hidrolisis enzimática del xilano.	95
5.3.6.1	Hidrolisis de xilano de haya.....	96
5.3.6.2	Hidrolisis de xilano de maíz.	97
5.3.7	Análisis de los XOS producidos en la reacción de hidrolisis de xilano de haya.	98
5.3.8	Análisis de los XOS producidos en la reacción de hidrolisis de xilano de Maíz.	99
5.3.9	Reutilización de los biocatalizadores.	100
5.3.9.1	Ciclo de reacciones con xilano de haya.....	101
5.3.9.2	Ciclo de reacciones con xilano de maíz.	102
5.3.10	Conclusión.	103
5.4	Estudio de la inmovilización-estabilización de la bioxilanasas en soporte celulosa.	105
5.4.1	Estudio de la Inmovilización-estabilización de la Bioxilanasas.	105
5.4.1.1	Inmovilización de la endoxilanasas comercial BIO por unión covalente multipuntual a glioxil-celulosa.....	106
5.4.1.2	Estabilización de los biocatalizadores de la xilanasas BIO inmovilizada en soporte glioxil-celulosa y modificada con polímeros viscosos.	107
5.4.2	Efecto de la multicapa de polímeros viscosos (MC) en el derivado obtenido a partir de la enzima BIO inmovilizada en soporte celulosa.	108
5.4.3	Análisis de la reacción química del xilano utilizando Cel BIO y Cel BIO MC como biocatalizador.....	111
5.4.4	Reutilización de los biocatalizadores: Ciclo de reacciones con xilano de haya.	112

5.4.5	Análisis de los XOS producidos en la reacción.	114
5.4.6	Conclusión.	114
6	CONCLUSIONES.	116
7	REFERENCIAS.	118
8	ANEXO CON ARTÍCULOS PUBLICADOS	134

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Biomasa Lignocelulósica.

El principal componente de la biomasa vegetal es la lignocelulosa, constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina, presentes en la pared de las células vegetales; que comprende la mitad del peso seco de las plantas (figura 1).

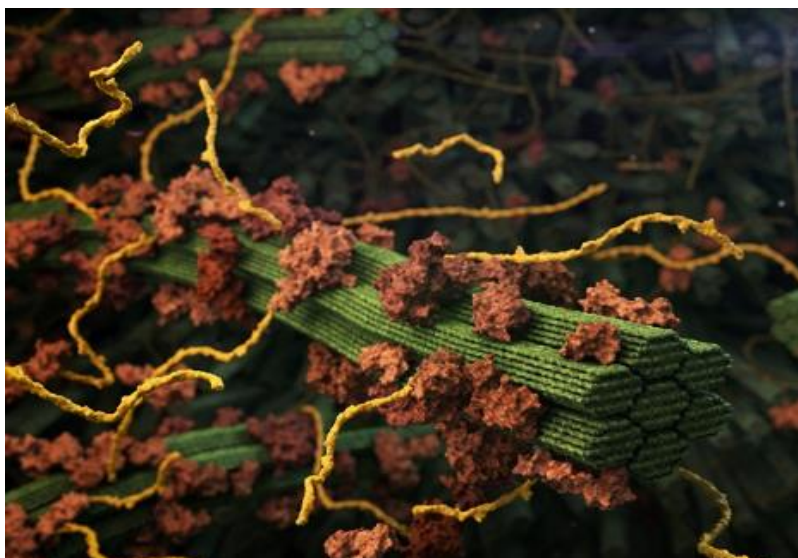


Figura 1 - Representación gráfica de la biomasa lignocelulósica basada en modelos computacionales, ilustra un nuevo estudio del Laboratorio Nacional de Oak Ridge sobre el funcionamiento interno de las paredes de las células vegetales durante la producción de bioenergía. Fibras de celulosa (verde), lignina (marrón) y hemicelulosa (amarillo). (Crédito de la imagen: Thomas Splettstoesser; <http://www.scistyle.com>). Fuente: Phys.org nws.

Sólo un pequeño porcentaje de estos polímeros, generados como subproductos de la actividad agrícola, se aprovecha en las industrias.

Muchos microorganismos producen un complejo de enzimas extracelulares que degradan la fracción de celulosa y hemicelulosa de la lignocelulosa posibilitando su aprovechamiento como fuente de carbono y

energía (Sánchez 2009). La biomasa lignocelulósica representa una materia prima abundante que puede utilizarse para producir biocombustibles ecológicos y productos químicos (Kovács, Szakacs et al. 2009). La celulosa y la hemicelulosa son los biopolímeros más abundantes en la naturaleza (Bayer and Lamed 1992).

1.2 Pared celular vegetal.

Las células de hongos, bacterias y vegetales han evolucionado convergentemente hasta presentar todas ellas la misma estructura extracelular, la pared celular. Una de las funciones comunes en todos ellos es que la pared actúa como sostén físico de las células (Sánchez 2009). Sin embargo, cada grupo posee unos componentes únicos y exclusivos de sus paredes celulares, destinadas a satisfacer las necesidades propias de cada grupo.

La pared celular está compuesta por muy diversos elementos, tanto proteicos como lípidos y glucídicos. Cada especie y cada tipo celular tienen una proporción de cada componente única. La pared celular vegetal está compuesta por tres polímeros principales: celulosa, lignina y hemicelulosa (Figura 2).

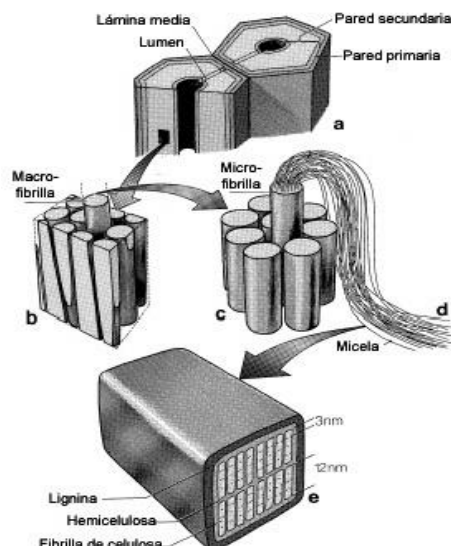


Figura 2 - Representación esquemática de la pared celular vegetal. a) Corte transversal de una fibra de madera mostrando la lámina media, la pared celular primaria y secundaria; b) Sección transversal de una porción de la pared secundaria con microfibrillas; c) Un manojo de microfibrillas; d) Los filamentos micelares; e) Corte transversal de una micela, mostrando la composición ultraestructural: la lignina, hemicelulosa y celulosa. El espacio entre las fibras vegetales (lámina media), microfibrillas, microfibrillas y los filamentos micelares está ocupado por lignina (Hüttermann, Mai et al. 2001).

1.2.1 Celulosa.

La celulosa es el principal constituyente estructural de las células vegetales, representando entre 35 y 50% del peso seco de las mismas. Su papel es exclusivamente estructural, dando a la célula protección osmótica y resistencia mecánica (Bayer and Lamed 1992). La celulosa es un homopolisacárido lineal compuesto por unidades de D-glucosa, unidas por enlaces glucosídicos del tipo β -1,4. Cada residuo de glucosa tiene una orientación de 180° en relación al residuo adyacente, formando así la celobiosa, la subunidad repetitiva del polímero. El extremo de la cadena de celulosa, en el que se encuentra un carbono anomérico libre, se denomina extremo reductor, y

el extremo en que el carbono anomérico no está disponible se denomina no reductor (Sandgren, Ståhlberg et al. 2005) (Figura 3).

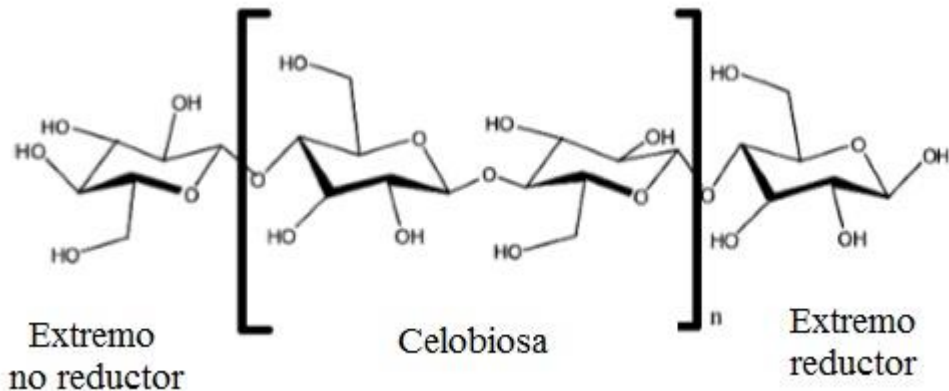


Figura 3 - Estructura molecular de la celulosa (Zhang and Lynd 2004).

Un número variable de unidades de glucosa (aproximadamente cien) forman fibrillas que se empaquetan, formando las microfibrillas de celulosa. Las fibrillas de celulosa se conectan por enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares y, además, por fuerzas de Van der Waals, formando microfibrillas rígidas e insolubles. Estas microfibrillas presentan regiones con alto grado de cristalinidad que se denominan regiones cristalinas y regiones menos compactas, con mayor distanciamiento entre las fibras, llamadas regiones amorfas. Además de las regiones amorfas, las fibras de celulosa presentan irregularidades, fallas y microporos que aumentan la superficie de contacto de la celulosa con otras moléculas como el agua y las enzimas (Lynd, Weimer et al. 2002).

1.2.2 Lignina.

La lignina, presente sólo en la pared celular secundaria, es un polímero, cuya estructura tridimensional no es uniforme, complejo que contiene cadenas de monómeros químicamente distintos, derivados de compuestos fenólicos (Sun and Cheng 2002, Arantes and Saddler 2010). La lignina está compuesta por 9 unidades de carbono, derivadas del alcohol cinamilo sustituido, que son p-cumarílico, coniferílico y alcohol sinapílico (Figura 4).

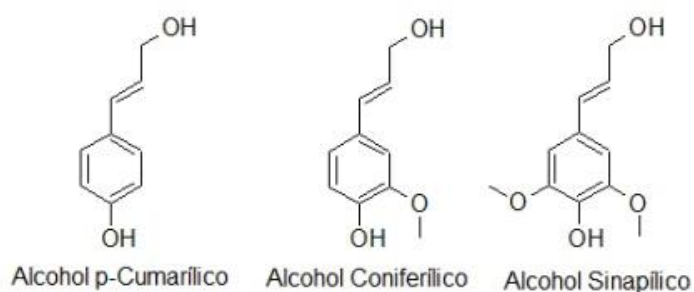


Figura 4 - Estructura molecular de los alcoholes constituyentes de la lignina.

Las ligninas son altamente ramificadas, no cristalinas, con estructura y composición química, que varía de acuerdo con la fuente de origen (Figura 5).

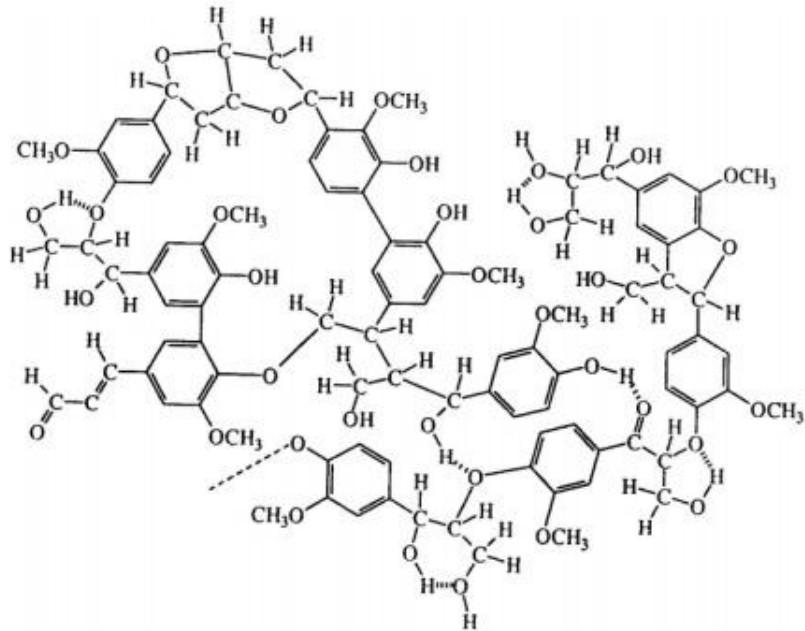


Figura 5 - Estructura molecular de la Lignina (Sjöström 1993).

Se encuentra ligada a la celulosa y la hemicelulosa, formando un entramado físico que constituye una barrera impenetrable en la pared celular de la planta, sirviendo de soporte estructural, lo que le confiere impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo (Sánchez 2009).

1.2.3 Hemicelulosa.

La hemicelulosa se encuentra en asociación con la celulosa en la pared de las células vegetales (Timell 1967). Está formada por heteropolisacáridos, conteniendo diferentes residuos de carbohidratos: D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, L-arabinosa, D-galactosa, L-ramnosa, ácido D-galacturónico y ácido D-

glucurónico, normalmente, formada por 2 a 6 azúcares diferentes, unidos en la mayoría de los casos por enlaces del tipo β -1,4 (Thompson 1991) (Figura 6).

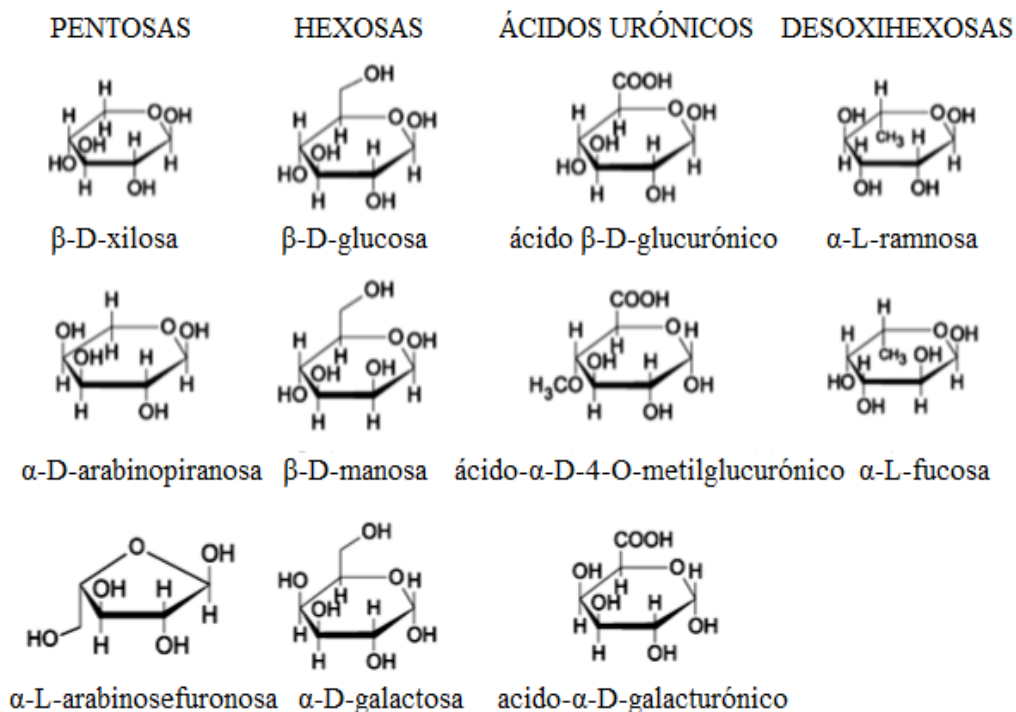


Figura 6 - Estructura molecular de los carbohidratos constituyentes de la hemicelulosa (Fengel and Wegener 1983).

Las hemicelulosas se clasifican de acuerdo con la identidad de los principales azúcares presentes, como glicanos, xilanos, mananos, galactanos y galtidanos (Thompson 1991, Bastawde 1992).

El xilano se encuentra en la interfaz entre la lignina y la celulosa, siendo importante en la unión de las fibras y en la integridad de la pared celular (Beg, Kapoor et al. 2001)(BEG et al., 2001).

1.3 Xilano.

El xilano es uno de los principales polisacáridos estructurales de células vegetales y el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (Prade 1996); se localiza sobre todo en la pared celular secundaria, formando una interfaz entre la lignina y los otros polisacáridos (figura 7).

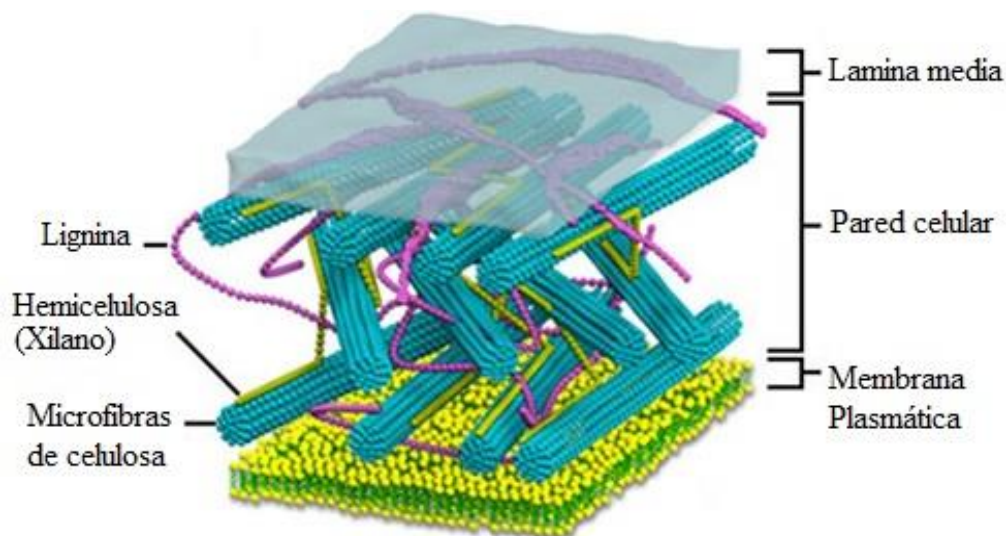


Figura 7 - Imagen representativa de la pared celular secundaria de una planta, (DE MAÍZ 2012).

Es uno de los principales constituyentes de la hemicelulosa. Un complejo que consiste en una estructura de base homopolimérica de unidades de β -D-xilopiranosas, que incluye, también, xiloglucano (heteropolímero de D-xilosa y D-glucosa), glucomanano (heteropolímero de D-glucosa y Dmanosa), galactoglucomanano (heteropolímero de D-galactosa, D-glucosa y D-manosa) y arabinogalactano (heteropolímero de D-galactosa y arabinosa) (Shallom and Shoham 2003). Todas, junto con la celulosa (1,4- β -glucano) y la lignina (un complejo polifenólico), forman casi toda la pared celular vegetal (Kulkarni, Shendye et al. 1999).

Dependiendo de la naturaleza del material lignocelulósico de los polímeros de xilosa (xilano), arabinosa (arabinano) o manosa (manano), se pueden sustituir en las ligaciones vía éter o éster, formando por ejemplo el α -o-glicopiranosil ácido urónico o 4 - metil derivados, grupos acetil y ácidos (Puls 1997, Ebringerova and Heinze 2000, Garrote, Cruz et al. 2004).

Hay evidencias de que el xilano y los residuos fenólicos de lignina están unidos por uniones covalentes, por otro lado las uniones a las moléculas de celulosa se establecen mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Ferreira-Filho 1994). En la naturaleza, el xilano es completamente hidrolizado a monosacáridos por acción conjunta de diversas enzimas. La heterogeneidad en la estructura del xilano es responsable de dicha diversidad de las enzimas xilanolíticas (Figura 8).

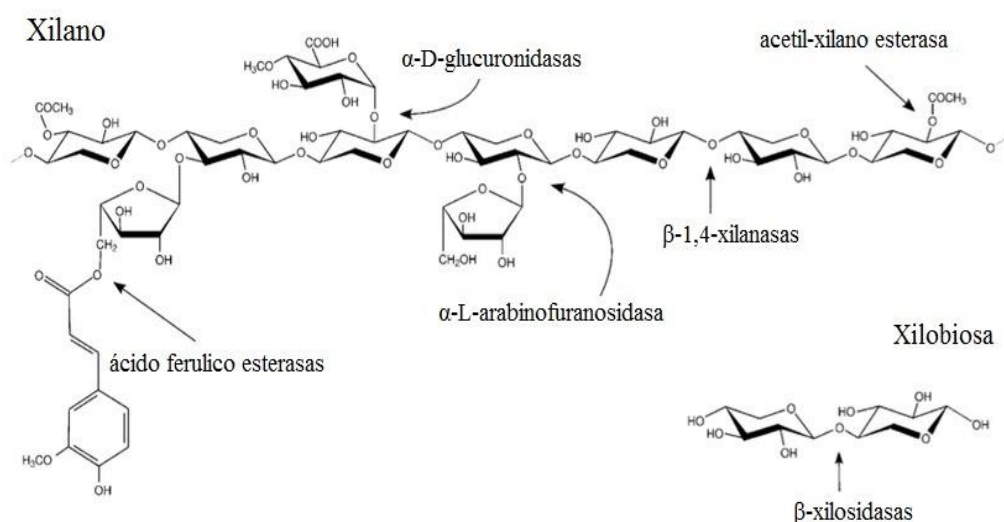


Figura 8 - Estructura del xilano y el sitio de ataque de las enzimas xilanolíticas (Pastor, Gallardo et al. 2007)

Estos grupos sustituyentes pueden ser un factor limitante que impiden una hidrólisis enzimática eficiente del sustrato (Ji, Huang et al. 2011). Por otro lado,

para la hidrólisis completa del xilano, se requiere de la acción sinérgica de un conjunto de enzimas xilanolíticas que tienen la capacidad de cortar la cadena principal y sitios de las cadenas laterales (van den Brink and de Vries 2011) (Figura 9).

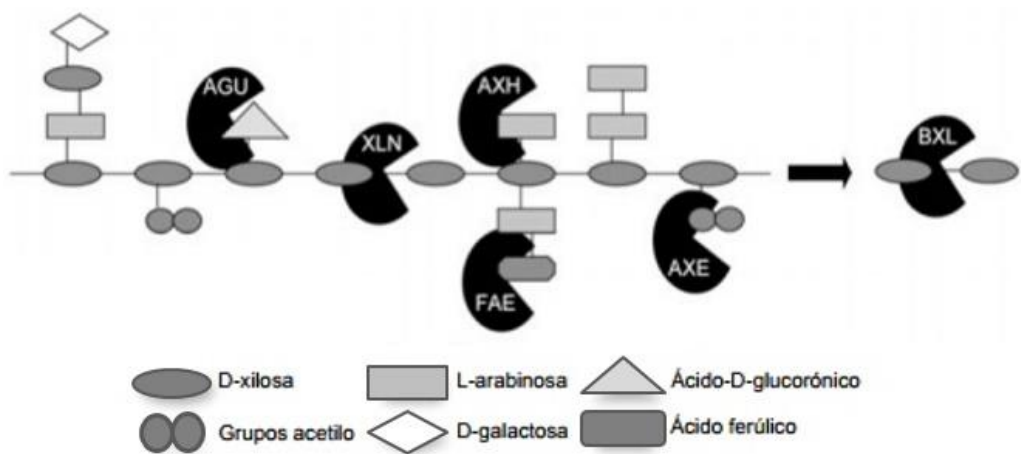


Figura 9 – Estructura del xilano y su interacción con enzimas hemicelulolíticas. AGU (α -glucoronidasa), XLN (β -1,4-endoxilanas), AXH (α -arabinofuranosidasa), FAE (feruloil esterasa), AXE (acetilxilanoesterasa), BXL (β -1,4-xilosidasa). Adaptado de (van den Brink and de Vries 2011).

El sistema de degradación del xilano incluye, en particular, β -1,4-xilanasas y β -xilosidasas, además de otras, como α -D-glucuronidasas, α -L-arabinofuranosidasa, acetil-xilana esterasa y ácido ferulico esterasas (Prade 1996, Beg, Kapoor et al. 2001). Las xilanasas actúan en los enlaces β -1,4 internos de las cadenas de xilano, para formar xilooligosacáridos (XOS) de diversos tamaños como producto final (Brodel, Samain et al. 1990, Shallom and Shoham 2003).

1.4 Xilanasas.

Las xilanasas son glucosidasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces 1,4- β -glucosídicos del xilano. Descritas por primera vez en 1955, las xilanasas fueron reconocidas por la Unión Internacional de Bioquímica y por la Unión Internacional de Biología Molecular (IUBMB) en 1961, cuando se atribuyó a ellas el número de clasificación EC 3.2.1.8 y el nombre endo-1,4- β -xilanasas; Sin embargo, poseen algunos sinónimos, como endoxilanasas, 1,4- β -D-xilano xilanhidrolasas, endo-1,4- β -D-xilanasas, β -1,4 xilanasas y β -xilanasas (Collins, Gerday et al. 2005) (figura 10). Las β -xilosidasas forman parte de un vasto grupo de enzimas implicadas en la producción de xilosa, una fuente primaria de carbono para el metabolismo celular de diversos organismos (Biely 1985, Webb 1992, Prade 1996).



Figura 10 – Estructura de la endo-xilanasas de *Trichoderma reesei* xyn II con dos láminas β formando un β -jelly roll.

Una forma útil para clasificarlas está basada en el análisis de sitios hidrofóbicos y alineamientos de secuencias, lo cual ha permitido su agrupación por familias de glucohidrolasas, tales como la familia 10 (formalmente llamada familia G) y la familia 11 (formalmente llamada de familia H). Además, se sabe que otras familias tales como la 5, 8 y 43 presentan una o dos enzimas con actividad xilanasa (Ji, Huang et al. 2011).

En general, las xilanasas microbianas son glicoproteínas monoméricas, que pueden estar en un rango de peso molecular que varía de 6 a 80kDa (Kulkarni, Shendye et al. 1999, Watanabe, Akiba et al. 2006, Butt, Tahir-Nadeem et al. 2008).

1.5 Principales aplicaciones de las xilanasas.

Las enzimas xilanolíticas de diversos microorganismos han sido bastante estudiadas en la última década, sobre todo debido a su potencial biotecnológico en varios procesos industriales. En la industria de alimentos, se pueden utilizar en la clarificación de jugos y vinos (Biely, Puls et al. 1985); En la elaboración de panes, con el objetivo de aumentar el volumen y mejorar la textura de la cáscara y la miga; Y en la etapa de filtración de la cerveza, rompiendo sólidos en suspensión (Mumtaz, Rehman et al. 2008).

La adición de la xilanasa termoestable de *Chaetomium* sp., en la producción de pan, aumentó el volumen en 20-24,5%, en relación al control, y disminuyó en 8,9-24,2% la rigidez del producto (Jiang, Cong et al. 2010). Según el estudio de (Qiu, Shi et al. 2010) en la industria de bebidas, gracias al uso de la xilanasa de *Streptomyces megasporus* expresada en *Pichia pastoris*, se observó una reducción de la tasa de filtración y de la viscosidad en el 36,33% y el 35,51%, respectivamente. En la industria ganadera también tienen un alto interés debido a que dan lugar a un aumento en la digestibilidad en las raciones para

aves y porcinos. También existe interés en su utilización para la producción de xilosa, xilobiosa y xilooligómeros, que pueden ser empleados como insumos para la obtención de xilitol o ácido láctico, por vía fermentativa (Wong, Tan et al. 1986, Pessoa Jr, De Mancilha et al. 1997).

En la industria, el sistema xilanolítico puede ser empleado de dos maneras:

1) asociado a polisacáridos.

Como ejemplo de sistema xilanolítico asociado a polisacáridos se tiene el uso en la hidrólisis de algodón y bagazo. La hidrólisis del algodón fue de 62-63% por las celulasas producidas con diferentes sustratos. En el caso del bagazo tratado con álcali, la celulasa producida en el salvado de trigo mostró mayor sacarificación (59%) que la obtenida utilizando la enzima cultivada en polvo de celulosa(46%) (Mishra, Seeta et al. 1985).

2) libre de celulasas;

Como ejemplo de sistema xilanolítico libre de celulasas, se tiene el uso de la β -xilanasa en el biotratamiento (pre-tratamiento microbiológico) en industrias de papel y celulosa, y en el procesamiento de fibras vegetales. Con la ausencia de celulasas, estos procesos se tornan más eficientes, ya que la celulosa es preservada (Biely 1985).

La acción de la xilanasa, en el tratamiento de las pulpas celulósicas, auxilia en la remoción de la lignina que queda después de la cocción, confiriéndoles un color más blanco. Con este tratamiento adicional, la cantidad de productos químicos blanqueantes utilizados, como el cloro, puede ser disminuida, aumentando la calidad del papel y reduciendo los impactos ambientales (Wong, Tan et al. 1986, Purkarthofer, Sinner et al. 1993). Por ejemplo, al aplicarse en el blanqueamiento, la xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* causó una disminución del 18,6% del número kappa (que define el

grado de deslignificación) y el aumento del 2,63% en el brillo de la pulpa (Bokhari, Rajoka et al. 2010).

Según el estudio de (Ko, Lin et al. 2010) se observó un aumento del 4,4% en el brillo, utilizando la xilanasa de *Paenibacillus campinasensis*. Otros usos de estas enzimas se mencionan en la revisión de (Beg, Kapoor et al. 2001):

- Mejoran la eficiencia de conversión alimenticia y la ganancia de peso en pollos debido a la reducción de la viscosidad intestinal causada por la incorporación de xilanasas en la dieta de estos animales;
- Ayudan en el tratamiento de desechos agrícolas e industriales y residuos hemicelulósicos, por la hidrólisis del xilano;
- Inducen la glicosilación y la acetilación de grasa de fitoesteroides en células vegetales;
- Mejoran la digestibilidad de los forrajes para rumiantes, además de facilitar el compostaje;
- Participan en la producción de alquil glicosidos, un prometedor surfactante, por medio de un proceso de transglicosilación directa del xilano;
- Aromatizan los mostos, los vinos y los jugos de frutas;
- Junto con otras enzimas (manosa, ligninasa, glucanasa, glicosidasa, etc.), pueden utilizarse para la generación de combustibles biológicos, como el etanol y el xilitol, a partir de la biomasa lignocelulosica;
- En conjunto con enzimas pectinolíticas, poseen potencial de aplicación en el desengomado de fibras, como lino, sisal, yute y ramio.

Una de las posibilidades que ofrecen dichas enzimas es la producción de XOS a partir de residuos agroindustriales. Según el estudio de (Teng, Yan et al.

2010) se utilizaron fragmentos de diversos tamaños de mazorca de maíz y, después del tratamiento de explosión a vapor a 196 °C, por cinco minutos, obtuvieron una solución que contenía 22,8% de hemicelulosa, que fue hidrolizada por la xilanasas de *Paecilomyces thermophila*. El resultado fue una producción máxima de 28,6 g de xilooligosacáridos por 100 g de xilano contenida en las mazorcas de maíz, con más del 90% de xilobiosa y xilotriosa.

El uso de XOS como ingredientes para alimentos funcionales está basado en sus beneficios para la salud, incluyendo su estabilidad en larga gama de pH y temperatura, metabolismo selectivo para las Bifidobacterias, aumento de la producción de ácidos grasos volátiles y reducción de lesiones de úlcera de estómago (Parajó, Garrote et al. 2004). Para la aplicación como ingrediente alimentario, la xilobiosa (grado de polimerización = 2) es también considerada como un XOS, aunque para otros compuestos el concepto “oligo” se asocia a un alto grado de polimerización (Tateyama, HAsHII et al. 2005). El grado de dulzura de la xilobiosa es equivalente al 30% en relación a la sacarosa, siendo la dulzura de los otros XOS moderada.

Los xilooligosacáridos presentan muchas ventajas si se comparan con los demás oligosacáridos en términos de estabilidad y efectos en la salud, como el estímulo al crecimiento de microbiota intestinal (principalmente *Lactobacillus sp.* y *Bifidobacterium bifidum*), junto a la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, promoviendo una serie de beneficios al organismo. En el aspecto tecnológico, estos compuestos presentan la gran ventaja de ser obtenidos a través de la degradación de residuos lignocelulósicos, presentando de este modo un sesgo económico favorable, así como su contribución significativa a la disminución de biomasa residual en el medio ambiente.

1.6 Fuentes y producción de xilanasas.

Las enzimas xilanolíticas, además de hidrolizar el xilano, en el proceso de germinación de algunas semillas, son importantes en la quiebra de la pared celular de vegetales, junto con otras enzimas que hidrolizan polisacáridos. Se pueden encontrar en vegetales superiores, algas marinas, protozoos, crustáceos e insectos, entre otros. Entre las fuentes microbianas, los hongos filamentosos son los de mayor interés, por secretarse, en el medio de cultivo, en niveles muy superiores a las procedentes de levaduras y bacterias. Además, en bacterias, la síntesis de la mayor parte de las xilanasas está restringida a los espacios intracelulares y periplasmáticos, y no sufre modificaciones, como la glicosilación (Polizeli, Rizzatti et al. 2005).

Las cepas más citadas para la producción industrial de xilanasas incluyen *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces lividans* (Beg, Kapoor et al. 2001, Polizeli, Rizzatti et al. 2005). Además de estas fuentes, se utilizan, también, *Aspergillus niger* y *Humicola insolens*. Entre los hongos mesófilos, los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* son preeminentes en la producción de xilanasas (Polizeli, Rizzatti et al. 2005).

Las xilanasas se suelen inducir en medios que contienen xilano o residuos ricos en xilano, pero también se describen inducciones en presencia de L-sorbosa, diversos xilooligosacaridos, xilosa y residuos lignocelulosicos (Beg, Kapoor et al. 2001). Aunque las xilanasas pueden ser producidas industrialmente, en medios sólidos, la mayor parte es obtenida mediante cultivo sumergido (Polizeli, Rizzatti et al. 2005). Para la producción de xilanasas mediante hongos se suelen utilizar una gran cantidad de sustratos como fuente de carbono, tales como el bagazo de caña de azúcar (Milagres, Santos et al. 2004, Bocchini, Oliveira et al. 2005, Sandrim, Rizzatti et al. 2005, Silva, Machuca et al. 2005), tallón de maíz (Jiang, Cong et al. 2010), césped (Bocchini, Oliveira et al. 2005, Silva, Machuca et al. 2005), salvado de trigo (Carmona,

Brochetto-Braga et al. 1998, Gawande and Kamat 1998, Goulart, Carmona et al. 2005, Silva, Machuca et al. 2005, Chapla, Divecha et al. 2010), residuos del árbol (Milagres, Magalhaes et al. 2005, Silva, Machuca et al. 2005), fibra de palmera (Lakshmi, Rao et al. 2009), agua de maceración de maíz (Fang, Liao et al. 2010), paja de arroz (Ko, Lin et al. 2010), residuo de naranja (Silva, Machuca et al. 2005, Alexandrino, Garcia de FARIA et al. 2007) o la hemicelulosa del grano de arroz y cebada (Harada, Tanaka et al. 2008, Mandalari, Bisignano et al. 2008). De acuerdo con los estudios hechos por (Silva, Machuca et al. 2005), la producción de xilanasa y carboximetilcelulosa por *Thermoascus aurantiacus*, en fermentación semisólida, se puede obtener utilizando diferentes tipos de residuos agrícolas (salvado de trigo, bagazo de caña de azúcar, bagazo de naranja, mazorcas de maíz, paja de maíz, hierba verde, hierba seca y serrín) como sustrato, sin enriquecimiento del medio.

Los autores observaron que el hongo usado poseía mayor actividad xilanolítica que celulolítica y que los mayores niveles de enzimas fueron producidos en mazorca y paja de maíz y granos verde y seco. La máxima actividad de la xilanasa fue a pH 5,0-5,5 75°C. (Silva, Machuca et al. 2005) estudiaron la producción de enzimas hidrolíticas por nueve cepas de setas *Lentinula edodes*, cultivadas en residuos de madera. La actividad de la xilanasa varió de 12958,3 a 16101,8 U.kg⁻¹ en el sustrato seco y hubo una correlación positiva entre el crecimiento fúngico y la producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas. Las técnicas de cromatografía en columna, sobre todo por intercambio iónico y exclusión molecular, se utilizan en los protocolos de purificación de las xilanasas, aunque otros métodos, como la cromatografía por interacción hidrofóbica, también se reportan. En muchos casos, el sobrenadante de los cultivos es inicialmente concentrado por medio de técnicas precipitantes o de ultrafiltración (Subramaniyan and Prema 2002).

A partir del xilano, una serie de productos económicamente importantes, tales como xilosa y xilitol pueden ser obtenidos. Se ha enfocado en este trabajo el objetivo de la producción de xilo-oligosacáridos (XOS), cadenas cortas de

xilosa, formadas por 2 a 10 unidades, cuyas características vienen conquistando un espacio creciente en la industria farmacéutica, química fina y como ingredientes alimentarios.

1.7 Estabilidad de las xilanasas.

Recientemente, las investigaciones con el aislamiento de microorganismos termófilos y extremófilos han recibido una atención especial, debido a que sus enzimas suelen ser más estables, mejorando la técnica y economía de los procesos industriales en hidrólisis de xilano. De modo general, dichas xilanasas mostraron una actividad máxima entre 40 ° C y 80 ° C, y pH entre 4,0 y 7,0 (Kulkarni, Shendye et al. 1999, Polizeli, Rizzatti et al. 2005). Diversos estudios de purificación y caracterización de las xilanasas presentaron valores óptimos de actividad en pH y temperaturas dentro de esa franja (KANDA, AMANO et al. 1985, Monti, Terenzi et al. 1991, Keskar 1992, de Almeida, Maria de Lourdes et al. 1995, Cardoso 2003, Medeiros, Hanada et al. 2003, Carmona, Fialho et al. 2005, Milagres, Magalhaes et al. 2005, Sandrim, Rizzatti et al. 2005, Guimarães, Peixoto-Nogueira et al. 2006, Harada, Tanaka et al. 2008, Shah and Gupta 2008, Wakiyama, Tanaka et al. 2008). Sin embargo, se han reportado xilanasas estables y activas en valores extremos de pH (2,0 a 11,0) y temperatura (5 a 105 ° C) (Collins, Gerday et al. 2005). Las xilanasas producidas por hongos suelen ser menos termoestables que las de bacterias, aunque diversos hongos mesófilos producen enzimas termoestables, como en el caso paradójico del género *Ceratocystis*, cuya xilanasas es estable a 80 °C durante una hora (Dekker and Richards 1975).

Los principales hongos termófilos estudiados incluyen *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanzada*, *Humicola grisea*, *Melanocarpus albomyces*, *Paecylomyces variotii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonii*, *Thermomyces lanuginosus* y

Thermoascus aurantiacus. Las xilanasas de estos hongos tienen temperaturas óptimas entre 60 ° C y 80 ° C, siendo muy estables en esa franja. Las enzimas mostraron un perfil de actividad máxima en pH ácido (4,5-6,5) (Polizeli, Rizzatti et al. 2005). (Goulart, Carmona et al. 2005) Purificaron parcialmente y caracterizaron la xilanasas de *Rhizopus stolonifer*. Se obtuvieron dos valores de pH (6,0 y 9,0) en los que la actividad de la enzima fue máxima, sugiriendo la presencia de más de una xilanasas en la fracción purificada. La enzima presentó, también, una temperatura óptima entre 40 ° C y 60 ° C. (Tavares, Gomes et al. 1997) Estudiaron un linaje alcalófilo y termófilo de *Bacillus sp.*, por poseer alta producción de xilanasas libre de celulasa. (Sharma, Chadha et al. 2010) Produjeron dos xilanasas del hongo termófilo *Malbranchea flava*, con una masa molecular de 25,2 y 30 kDa. Las enzimas obtenidas fueron más activas a pH 9,0 y 60 ° C, con una vida media de cuatro horas a esa temperatura.

El uso de estas xilanasas tiene una gran importancia en diversos usos industriales que requieren altas temperaturas, como el blanqueamiento de la pulpa kraft. (Wakiyama, Yoshihara et al. 2010) Purificaron una endo-1,4- β -xilanasas extracelular, con actividad específica de 566 U mg⁻¹, del filtrado del cultivo del hongo filamentoso *Aspergillus japonicus*, crecido en xilano de avena. La enzima presentó una masa molecular aparente de 25,1 kDa y una actividad máxima a pH 5,0 y 60 ° C. La proteína demostró una identidad del 69% con la xilanasas producida por *Aspergillus niger*. (Jiang, Cong et al. 2010) Aislaron una nueva xilanasas termófila de *Chaetomium sp.*, que presentó actividad de 131 U.mL⁻¹ cuando crece en un medio que contiene 3,5% de mazorca de maíz, a 37 ° C, por seis días. La masa molecular estimada fue de 25,1 kDa, y la máxima actividad la presentó a pH 7,5 y a 65 ° C.

También se están realizando varios estudios con xilanasas en el campo de la ingeniería genética, buscando una mayor producción de enzimas más estables. (Qiu, Shi et al. 2010) Realizaron una expresión genética de la xilanasas de *Streptomyces megasporus* en *Pichia pastoris*. La enzima presentó una actividad máxima a pH 5,5 y 70 ° C, con buena estabilidad a 60-70 ° C y a pH 4,0-11,0.

Los productos de hidrólisis fueron, principalmente, xilosa y xilobiosa. (Han, Oh et al. 2010) Clonaron el gen de una xilanasas de *Streptomyces thermocarboxydus*, obteniendo la enzima con masa molecular de 43,96 kDa y una actividad máxima a pH 6,0 y a 55 ° C.

1.8 Xilo-oligosacáridos.

1.8.1 Como ingredientes prebióticos.

Los alimentos prebióticos surgieron en 1908 con la producción de leches fermentadas utilizando cultivos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Su actividad se basa en el hecho de que la flora del colon, como las bifidobacterias y lactobacilos considerados beneficiosos para la salud humana, pueden ser selectivamente estimulados por carbohidratos indigeribles a través de la fermentación (Cummings, Macfarlane et al. 2001, Joint 2002).

El término prebióticos fue introducido por primera vez por (Gibson and Roberfroid 1995) y pueden definirse como "ingredientes alimentarios no digeribles que afectan de manera beneficiosa al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y / o la actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon ". Un microorganismo es considerado probiótico si el mismo es habitante normal del tracto gastrointestinal, sobrevive a el paso por el estómago y mantiene la viabilidad y actividad en el intestino (Joint 2002).

Entre los más conocidos, para los cuales existe evidencia científica de sus propiedades en humanos, se encuentran los oligo o polisacáridos de fructosa (FOS e inulina, respectivamente) o de galactosa (GalOS), así como la lactulosa y los oligosacáridos de leche humana (Corzo, Alonso et al. 2015).

Además de las diferentes aplicaciones citadas, las xilanasas vienen recibiendo importante destaque en la producción de XOS como potenciales ingredientes prebióticos. Aunque no tienen aprobación para uso alimentario en

gran parte de los países, los XOS se consumen por lo menos hace dos décadas en Asia, sobre todo en Japón. Los prebióticos son alimentos funcionales, definidos como ingredientes selectivamente fermentables, que permiten alteraciones específicas en la composición y / o en la actividad de la microbiota intestinal, otorgando beneficios al bienestar y la salud del huésped (Gibson, Probert et al. 2004). Por ejemplo, las bifidobacterias intestinales son conocidas por estimular el sistema inmune, producir vitamina B, inhibir el crecimiento de patógenos, reducir los niveles sanguíneos de amoníaco y colesterol y auxiliar en la restauración de la flora normal, después de la terapia con antibióticos (Gibson and Roberfroid 1995). Varios estudios se citan en la revisión de (Aachary and Prapulla 2011), y parece todavía haber cierta controversia en cuanto al uso de cada xilooligosacarido por diferentes microorganismos, así como el mecanismo involucrado. Sin embargo, hay consenso que los XOS favorecen el crecimiento selectivo de bifidobacterias y sólo de algunas especies de *Lactobacillus sp.*

Los beneficios citados referentes al consumo frecuente de XOS en la dieta alimentaria son diversos, además del ya mencionado estímulo de la flora intestinal selectiva. Poseen efecto antioxidante, promueven el aumento de la actividad biológica del calcio en el organismo y estimulan la actividad inmunológica con efecto antitumoral (Tuohy, Rouzaud et al. 2005, Nabarlatz, Ebringerová et al. 2007). En un estudio realizado, (Campbell, Fahey et al. 1997) alimentaron ratones con dieta que contenía un 6% (m / m) de XOS durante 14 días y se verificó un aumento significativo de la concentración de bifidobacteria fecal. (Van Craeyveld, Swennen et al. 2008) verificaron un aumento entre 1 y 1,5 unidades en la concentración de bifidobacteria fecal de ratón durante 14 días con XOS de cadena corta. En estudios recientes, XOS ha presentado un mayor efecto sobre el aumento en el crecimiento de las especies de bifidobacteria, siendo preferentemente fermentados cuando se comparan con los azúcares prebióticos usados como referencia, como los frutos oligosacáridos (2 a 10 moléculas de sacarosa, en las cuales una o dos unidades de fructosa se añaden

por conexión b- (2-1) a la molécula de fructosa y de sacarosa) (de Sousa, dos Santos et al. 2011).

La ventaja de los xilooligosacáridos, si se compara con los frutos oligosacáridos (FOS), es que los XOS son más estables en un amplio rango de pH (2,5-8,0) y temperatura (por encima de 100 ° C). Además, poseen olor aceptable, no causan caries y son de bajo valor calórico, lo que permite su uso en dietas de reducción de peso corporal (Vazquez, Alonso et al. 2000). Así, los XOS podrían añadirse a productos alimentarios, como leche de soja, refrescos, productos lácteos, pasteles, galletas, o incluso, en preparaciones especiales para ancianos o niños (Aachary and Prapulla 2011).

El enriquecimiento de yogurt con XOS en diferentes proporciones fue estudiado en análisis físico-químicos y sensoriales (Mumtaz, Rehman et al. 2008). Los resultados mostraron que la adición de hasta un 3,5% de XOS no influye en el sabor y la aceptabilidad del producto.

1.9 Uso de las enzimas en las industrias.

En 2004, la demanda global de enzimas industriales fue de 2.500 millones de dólares, con un crecimiento anual del 5-10%. Estados Unidos, Europa y Japón son responsables de más del 90% de las ventas mundiales (Iyer and Ananthanarayan 2008). Entre varias empresas proveedoras de enzimas, una se destaca.

Novozymes es líder mundial en bioinnovación. Sus negocios proceden de la producción y comercialización de enzimas y microorganismos para uso industrial. En el 2016 el 36% de sus ventas fueron en Europa, y sus mayores clientes fueron las industrias de detergentes (Figura 11).

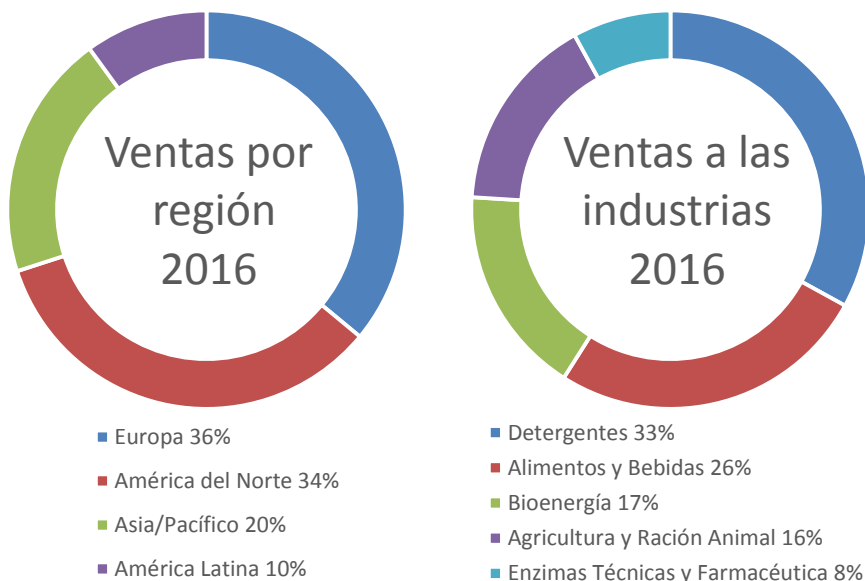


Figura 11 – Porcentajes de ventas por regiones e industrias por la empresa Novozymes en el año 2016. Fuente: Novozymes - repense o amanhã, Disponible en: https://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/news/factsheet/Documents/Factsheet_2017_PTBR.pdf?la=en Acceso en: 25 Jul. 2017

En comparación con los procesos químicos convencionales, estos biocatalizadores operan en condiciones más suaves, produciendo menor cantidad de residuos tóxicos, de emisiones y de subproductos. En virtud de su selectividad, las enzimas disminuyen la necesidad de purificación posterior del producto, reduciéndose así la demanda de energía y el impacto ambiental (Gavrilescu and Chisti 2005). En el caso de la producción de XOS, hay, además, la conveniencia de minimizar la producción del monosacárido xilosa, además de ser innecesario el uso de equipos especiales de purificación posterior tras el proceso de producción (Aachary and Prapulla 2011).

Si bien poseen diversas ventajas, las enzimas son solubles y, generalmente, muy inestables fuera de estrechas franjas de temperatura y pH; sufren inhibición por sustratos y productos y, muchas veces, no poseen la selectividad adecuada cuando el objetivo de la reacción catalítica trabaja bajo condiciones experimentales no convencionales.

Las reacciones, en las industrias, a veces son realizadas bajo diversas condiciones, como altas temperatura y presión, pH extremos y ambientes no acuosos. Un aumento de la temperatura, alteraciones de pH o uso de solventes orgánicos pueden presentar ventajas debido a la reducción del riesgo de contaminación, la disminución de la viscosidad y el aumento de la solubilidad del sustrato y de la tasa de transferencia de masa. Estas condiciones pueden, también, aumentar la velocidad de formación del producto y / o disminuir subproductos indeseables (Liszka, Clark et al. 2012).

Por los diversos factores citados, en diversos procesos, el uso de altas temperaturas en reacciones enzimáticas es de fundamental importancia en las industrias farmacéuticas, alimentación humana y animal, detergente, cuero, papel e industria textil (Iyer and Ananthanarayan 2008). Sin embargo, las condiciones extremas de reacción se vuelven a menudo inadecuadas para las enzimas, que pueden desnaturalizarse. La desnaturalización es el desdoblamiento de la estructura terciaria de la enzima en un polipéptido desordenado, en el cual los residuos clave no se encuentran alineados correctamente y no están lo suficientemente cerca para participar en las interacciones funcionales o estructurales de estabilización (Figura 12).

Después del desdoblamiento de su estructura tridimensional, la proteína puede estar sujeta a diversas alteraciones químicas, entre ellas a la pérdida irreversible de actividad, es decir, volviéndose inactiva (Fágáin 1995).

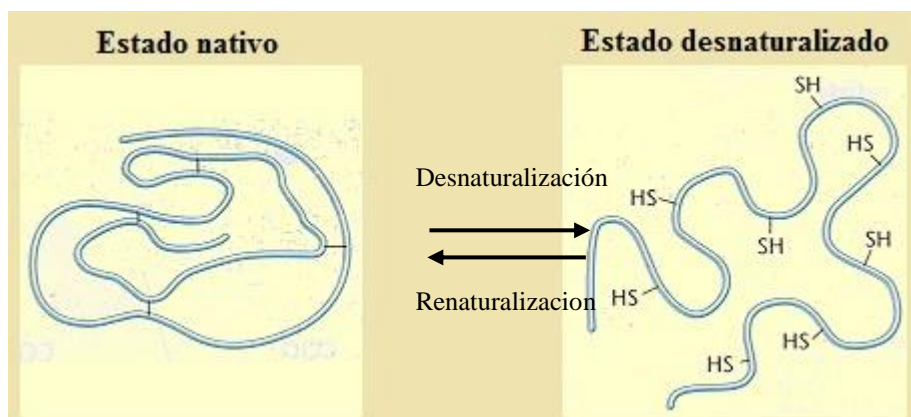


Figura 12 – Representación gráfica de la pérdida de la estructura y la función de una proteína. Diferencia entre desnaturalización y renaturalización. Fuente: Fagain, 1995 (adaptado y traducido).

La estabilidad de una enzima depende de muchos factores, como la temperatura, el pH, el estrés oxidativo, los solventes, la unión de iones metálicos o cofactores, la presencia de surfactantes, etc. Se ha comprobado que, salvo excepciones, las enzimas con alta estabilidad térmica también tiene una alta resistencia a otros factores desnaturalizantes (Eijsink, Gåseidnes et al. 2005).

Existe un gran número de estudios que dotan a las enzimas la capacidad de catalizar reacciones en condiciones no usuales y de gran interés para el desarrollo de los procesos industriales (Liszka, Clark et al. 2012). Con este propósito, se puede destacar tres líneas de investigación:

- clasificación y aislamiento de enzimas de termofilos;
- producción de enzimas estables en organismos mesofilos modificados genéticamente;
- estabilización por métodos de ingeniería proteica (evolución dirigida), modificación química, uso de aditivos o por inmovilización (Iyer and Ananthanarayan 2008).

Las enzimas mesofílicas son menos efectivas a temperaturas más altas o más bajas (es decir, por encima de 40° C o por debajo de 25° C) debido a la disminución de la estabilidad de la enzima, lo que lleva a una semivida más baja y a una menor actividad (Liszka, Clark et al. 2012). Los organismos termofílicos e hipertermófilos, que prosperan en una gama de temperaturas de 50 a 110° C, pueden ser una fuente de enzimas termostáticas, mientras que los psicrófilos producen una variedad de enzimas que funcionan bien por debajo de 25° C. Aunque una amplia gama de enzimas puede ser encontrada en termófilos y psicrófilos, la clonación y la expresión de esas enzimas extremofílicas pueden ser problemáticas y su rango de temperatura útil puede ser prohibitivamente estrecha (Gomes and Steiner 2004). El último problema fue abordado por la ingeniería proteica. Por ejemplo, la ingeniería de una proteasa psicrófila del *Bacillus* TA41 aumentó su actividad y estabilidad a temperaturas más altas sin alterar su actividad a temperaturas más bajas, utilizando una estrategia combinada de mutagénesis aleatoria, mutagénesis de saturación y recombinación *in vitro* (DNA shuffling) para generar bibliotecas mutantes, que fueron seleccionadas para identificar enzimas que adquirieron mayor termoestabilidad sin sacrificio de baja temperatura actividad. (Miyazaki, Wintrode et al. 2000). Este resultado indica que, aunque la enzima fue optimizada por la naturaleza para una determinada temperatura, fue posible ajustar su estabilidad en una gama más amplia de temperaturas *in vitro*. (Liszka, Clark et al. 2012).

La inmovilización en soportes sólidos tal vez sea la estrategia preferida y más utilizada para mejorar la estabilidad de biocatalizadores. El control operacional, la fácil recuperación del producto (sin la contaminación del catalizador) y la flexibilidad para diseñar nuevos reactores son algunas de sus ventajas.

Con la inmovilización, la estabilidad térmica resulta, sobre todo, del endurecimiento molecular causado por la unión de la enzima al soporte sólido y por la creación de un microambiente protegido (Iyer and Ananthanarayan 2008). En consecuencia, la estabilización de la estructura tridimensional de la proteína ofrece una protección contra la desnaturalización causada por agentes desnaturalizantes, como la temperatura, el pH y la presencia de disolventes orgánicos.

1.10 Biocatálisis.

1.10.1 Inmovilización de enzimas.

Las enzimas son biocatalizadores con excelentes propiedades para su uso industrial; sin embargo, su empleo aún no se ha generalizado totalmente en los procesos químicos industriales debido principalmente a dos grandes factores: su dificultad de ser recuperado y reciclado, encareciendo el costo del proceso, y su limitada estabilidad operacional, que desemboca en la inactivación irreversible del catalizador, perdiendo totalmente su actividad.

Así, para la aplicación práctica, la inmovilización de microorganismos o enzimas en materiales sólidos ofrece muchas ventajas, entre las cuales se encuentran el reuso de la enzima, la fácil separación del producto y el aumento de la estabilidad enzimática (Beg, Kapoor et al. 2001). El término "enzimas inmovilizadas" (derivado) se refiere a enzimas físicamente confinadas o localizadas en una determinada región de espacio, con retención de sus propiedades catalíticas, y que pueden ser utilizadas de forma repetida y continuada (Brena and Batista-Viera 2006).

La unión de una enzima a un soporte permite tener un catalizador que puede lograr superar los problemas que presenta en su uso industrial. Sin embargo, la inmovilización no necesariamente implica la estabilización de la enzima. Ésta solo se logrará utilizando estrategias de inmovilización que

involucran la rigidificación de la estructura terciaria de la proteína, por lo que es muy importante la selección del sistema de inmovilización adecuado para lograr la estabilización enzimática óptima (Mateo, Palomo et al. 2007).

Existen distintos métodos de inmovilización y a menudo se clasifican según el tipo de interacción físico-química usada en la unión entre el soporte y la enzima. Como cualquier proceso físico o químico, tanto la velocidad como el rendimiento de la inmovilización están determinados por distintos parámetros entre los que se encuadran: el tipo de soporte, el método elegido de inmovilización, la concentración de enzima y de grupos reactivos en el soporte, el pH, la temperatura y el tiempo de reacción (Buchholz and Klein 1987).

Además, el hecho de inmovilizar podría provocar que las propiedades del biocatalizador inmovilizado sean distintas a la enzima soluble debido a que éstas ahora vienen determinadas, tanto por las características de la enzima como por las del soporte sobre el cual se inmoviliza. De manera que la interacción entre ambos dará lugar a un derivado enzimático con propiedades químicas, bioquímicas y mecánicas específicas (Tischer and Kasche 1999). Por eso, las múltiples técnicas de inmovilización, permiten modificar las propiedades de las enzimas respecto a la enzimas soluble, mejorando su actividad, selectividad, estabilidad o reduciendo problemas de inhibición (Mateo, Palomo et al. 2007).

1.10.1.1 Inmovilización en soportes.

El soporte ideal para la inmovilización de una enzima debe: poseer resistencia física a compresión, ser de fácil de funcionalizar, ser biocompatible, ofrecer resistencia al ataque microbiano y de bajo costo. Las enzimas pueden ser ligadas a un soporte (orgánico o inorgánico) por diferentes tipos de interacciones que van desde una adsorción física o interacciones ligeras iónicas reversibles hasta las estables conexiones covalentes. Los métodos de inmovilización enzimática se pueden clasificar en reversibles e irreversibles (Brena and Batista-Viera 2006).

1.10.1.2 Inmovilización reversible.

Las enzimas inmovilizadas de forma reversible pueden retirarse del soporte en condiciones suaves, un método altamente atractivo cuando la actividad enzimática se ha deteriorado, el soporte puede regenerarse y recargarse con enzima fresca (Sardar, Roy et al. 2000, Brena and Batista-Viera 2006).

Las fuerzas que intervienen en la adsorción iónica de la proteína al soporte son, en su mayoría, de tipo electrostático (interacciones iónicas y puentes de hidrógeno) y aunque estas fuerzas son débiles, si abundan, son suficientes para generar una unión estable entre la enzima y el soporte (Mohamad, Marzuki et al. 2015).

Los protocolos de inmovilización son generalmente simples; basta poner en contacto la enzima con el soporte bajo condiciones suaves de reacción (baja fuerza iónica). Estos métodos de inmovilización reversible, pero de unión muy fuerte, serían muy útiles en los que el coste del soporte representa un valor importante dentro del coste global del biocatalizador.

Con este método no se suelen alcanzar grandes factores de estabilización como en la inmovilización irreversible, debido a que no son capaces de rigidificar la estructura terciaria, sin embargo, en las enzimas multiméricas esta estrategia ha demostrado estabilizar la estructura cuaternaria al evitar la desorción de las subunidades de la enzima (Torres, Mateo et al. 2002, Torres, Pessela et al. 2004).

1.10.1.3 Inmovilización irreversible o covalente

En el caso de la inmovilización irreversible, la enzima está unida de forma que cuando el catalizador se inactiva, se ha de eliminar todo el biocatalizador (enzima y soporte) (Gupta 1991). Este método supone la unión irreversible entre la enzima y el soporte. Los enlaces que se forman son fuertes y

estables, impidiendo que la enzima se libere al medio de reacción (Leckband and Langer 1991).

La unión covalente puede establecerse a través de grupos funcionales que están presentes en la superficie del soporte activado y los grupos $-\text{NH}_2$ (lisinas), $-\text{SH}$ (cisternas), $-\text{OH}$ (tirosinas y serinas), $-\text{COOH}$ (aspárticos y glutámicos) que están presentes en la superficie de la proteína. Se logra de esta manera que la enzima quede irreversiblemente unida al soporte a través de enlaces tipo amida, tio-éter, éter, enlaces carbamatos, etc (Srere and Uyeda 1976).

1.10.1.3.1 Unipuntual sobre soportes activados con grupos bromocianógeno-agarosa (CNBr).

Desde la década de 1970, se ha venido inmovilizando anticuerpos sobre soportes activados con grupos CNBr. En 1978, (Levy and Eveleigh 1978) unieron anticuerpos monoclonales a columnas de CNBr-agarosa, y estudiaron su unión covalente sobre el soporte. La inmovilización se realiza a baja temperatura y pH neutro, para que la unión sea lenta, por lo que la interacción entre la enzima y soporte procede a través del grupo amino más reactivo de la proteína (el amino terminal) de modo que casi no existe rigidificación de la estructura de la enzima (Mateo, Abian et al. 2005) La incubación se realiza en un corto tiempo para evitar que se produzcan más interacciones entre la enzima y el soporte ya que lo que se busca en este trabajo es simular el comportamiento de la enzima soluble pero sin los posibles problemas de agregación. Al final, el soporte debe ser resuspendido en etanolamina para bloquear cualquier grupo reactivo restante (Bolívar, Rocha-Martín et al. 2012) (Figura 13).

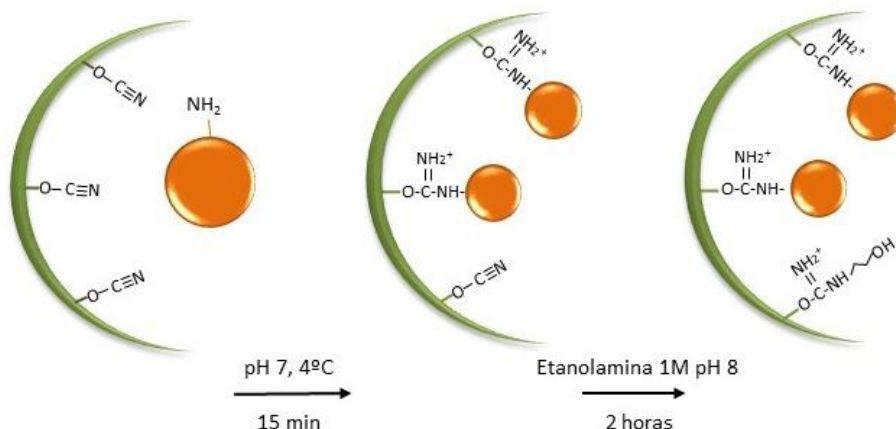


Figura 13 - Inmovilización covalente unipuntual sobre soporte CNBr-agarosa. (figura adaptada (Moreno Pérez 2015)).

1.10.1.3.2 Multipuntual sobre soporte activados con grupos glioxil.

Cuando una enzima se encuentra unida al soporte, por más de un residuo, su estructura terciaria tiende a permanecer inalterada frente a los posibles cambios conformacionales que puedan provocar distintos agentes distorsionantes (calor, pH, disolventes orgánicos, etc). De esta manera, la estabilidad de una enzima unida de forma covalente multipuntual al soporte es, por lo general, mayor que la de la enzima soluble y que la enzima unida al soporte por un solo punto (Klibanov 1983, Gianfreda and Scarfi 1991, Gupta 1991, Pedroche, del Mar Yust et al. 2007).

Un sistema adecuado de inmovilización requiere una serie de características para facilitar la unión covalente multipuntual entre la enzima y el soporte. Estas características hacen referencia a la naturaleza del soporte, a los grupos reactivos del mismo y las condiciones de inmovilización (Mateo, Palomo et al. 2007).

Entre los soportes preparados a partir del gel de agarosa, está el glioxil-agarosa, obtenido por la transformación de los grupos glioxilo de la agarosa en grupos glicerol, siendo luego llevados a glioxil (Guisán, Bastida et al. 1997).

Este soporte (con pequeños grupos aldehídos alifáticos) orienta la inmovilización de la enzima a través de su área de superficie con una mayor densidad de grupos amino, los grupos ϵ -amino de las cadenas laterales de las lisinas principalmente. En condiciones neutras de pH, durante el proceso de inmovilización, se establecen preferentemente las conexiones con los grupos amino-terminal, mientras que a valores básicos de pH (10,0-10,2) se posibilita que los grupos amino de las lisinas establezcan vínculos entre estos residuos y el soporte (Guisán, Bastida et al. 1997).

La inmovilización en este tipo de soportes activados con grupos glioxil se describe como un sistema bastante adecuado para la inmovilización por conexión por enlaces covalente multipuntual.

Este soporte presenta una monocapa de grupos aldehídos totalmente expuestos al medio con los que reaccionan fácilmente los aminos primarios no ionizados de la enzima. Estos grupos tienen además un brazo espaciador muy corto, de forma que parte de la superficie de la enzima queda muy próxima a la superficie del soporte lo cual confiere a la enzima inmovilizada mayor rigidez y, quizás, una mayor estabilidad (figura 14).

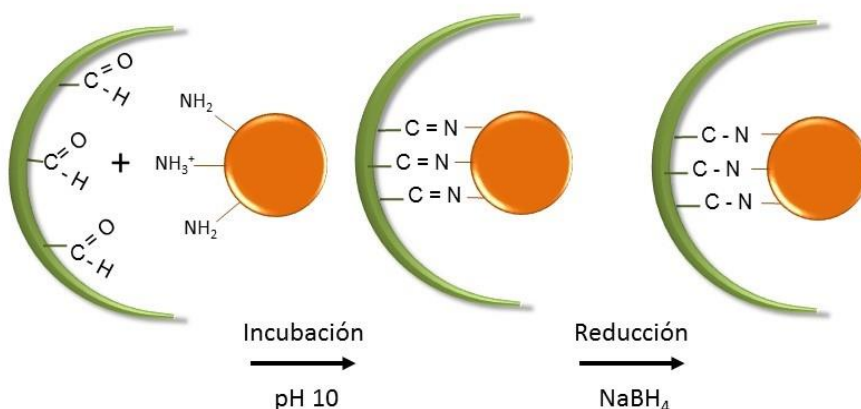


Figura 14 - Ilustración de una enzima hipotética, inmovilizada en glioxil-agarosa. La reducción con borohidruro de sodio hace irreversibles las conexiones imino formadas entre enzima y soporte (figura adaptada (Moreno Pérez 2015)).

Este sistema, como todos los otros, presenta algunas desventajas que hacen que no cumpla con todas las características de un sistema ideal: La necesidad de inmovilizar a un pH muy básico (pH 10), en el que algunas enzimas son poco estables; el uso de borohidruro (Blanco and Guisán 1989) en la reducción de enlace tipo base de Schiff, puede representar un problema cuando se piensa en una producción a nivel industrial y por último que dicho sistema estrictamente inmoviliza proteínas a través de la zona más rica en lisinas y aunque estos residuos son muy abundantes en la superficie de la mayoría de las proteínas, algunas proteínas presentan muy pocos de estos residuos en su superficie, dificultando su estabilización en este tipo de soporte (Guisán, Bastida et al. 1991, Bolivar, Wilson et al. 2006).

A pesar de ello, un gran número de enzimas han sido inmovilizadas y bien estabilizadas en este tipo de soporte, como penicilina G acilasa de *Escherichia coli* y *Kluyvera citrophila*, tripsina, quimiotripsina, alcalasa, carboxipeptidasa A, ferredoxina-NADP reductasa, esterasa, termolisina, D-aminoácido oxidasa, catalasa, Lipasas de diferentes fuentes, uroquinasa, L-aminoacilasa, y quitosanasa (Mateo, Abian et al. 2005).

1.10.2 Técnicas post-inmovilización de la superficie del catalizador inmovilizado.

Mejorar las propiedades catalíticas de las enzimas, modificando física o químicamente su superficie después del proceso de inmovilización (post-inmovilización), tiene un enorme potencial (Bai, Koh et al. 2006, Palomo, Segura et al. 2007). Estas modificaciones generalmente pretenden alterar las interacciones superficiales de la enzima, provocando así, cambios en la

configuración del biocatalizador que, de alguna manera, afecten a su actividad, selectividad y especificidad; las modificaciones, además, son mucho más fáciles de llevar a cabo con la enzima en fase sólida que en solución, debido a que estas, inmovilizadas, se encuentran perfectamente dispersadas sobre la superficie del soporte, contando además con todas las ventajas que la inmovilización proporciona.

Por otro lado, en este contexto, tanto los grupos amino como carboxilo presentan características ideales para ser modificados, gracias a su alta reactividad y densidad en la superficie proteica. Esto, siempre y cuando no estén involucrados directamente en el proceso catalítico.

1.10.2.1 Modificación Química.

La modificación química es una forma sencilla y rápida de obtener biocatalizadores mejorados. Ampliamente utilizada para alterar las propiedades catalíticas o de la estabilidad de las enzimas (Lenders and Crichton 1984, Alcalde, Plou et al. 1998, Davis 2003), aunque en los últimos tiempos la ingeniería genética le está quitando protagonismo (Ó'Fágáin 2003). Cuando se compara con las técnicas de mutagénesis, la modificación química presenta una serie de ventajas. En primer lugar, no es necesario conocer la estructura tridimensional exacta de la proteína. Segundo, que la enzima está ya plegada, el proceso de plegamiento no se verá afectado por la modificación. Tercero, permite la introducción de grupos reactivos que pueden presentar propiedades distintas a las de los aminoácidos naturales (Lundblad 2014) y cuarto, es una técnica muy simple y rápida.

Por el contrario, aunque sabemos que los residuos más reactivos expuestos al medio son los que se pueden modificar, no es posible controlar qué residuos, de todos ellos en concreto, son los que se alteran (López-Gallego, Montes et al. 2005). Las desventajas que puede tener la modificación química en este caso, es que es necesaria realizar la modificación en todas las ocasiones

que preparamos el catalizador y que no puede ser dirigida a un determinado residuo (Davis 2003, Cowan and Fernandez-Lafuente 2011, Díaz-Rodríguez and Davis 2011).

1.10.2.1.1 Aminoetilamidación química de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA).

Una de las modificaciones más utilizadas se puede llevar a cabo haciendo la aminación química de los grupos carboxilos de la superficie enzimática (aspárticos y glutámicos) con 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) en presencia de etilendiamina (EDA) donde los grupos carboxilos de la proteína pueden ser transformados en aminos primarios (Hoare and Koshland 1967). La reacción permite la formación de un enlace amida entre grupos carboxilo activados de la proteína y uno de los grupos amino de la EDA, dejando un grupo amino primario libre (Figura 15).

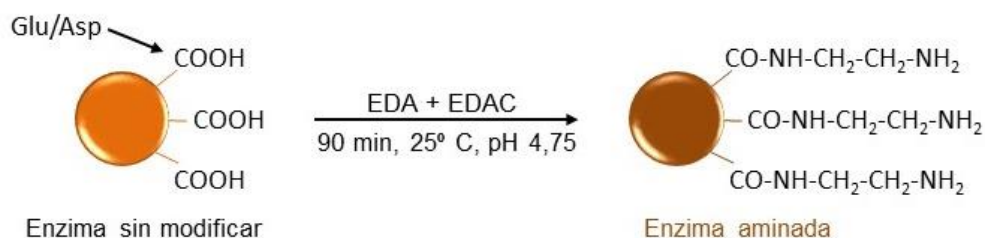


Figura 15 - Mecanismo de modificación química: Aminoetilamidación química de grupos carboxilo.

Este grupo amino primario introducido presenta un valor de pKa en torno a 5.5 (Fernandez-Lafuente, Rosell et al. 1993) por lo que es reactivo a valores de pH menores que el grupo -NH_2 de las lisinas superficiales. El número de grupos carboxilo superficiales modificados se puede controlar variando la concentración

de EDAC usada durante la reacción (Hoare and Koshland 1967, Fernandez-Lafuente, Rosell et al. 1995).

1.10.2.2 Modificación físico-química.

En otros casos, las modificaciones son generalmente realizadas usando polímeros. El carácter polifuncional de estos puede permitir la interacción iónica multipuntual entre el polímero que posee grupos catiónicos (como la polietilenimina (PEI)) o aniónicos (dextrano (Dx)) (Figura 16). De este modo, la adsorción puede ser lo suficientemente fuerte como para mantener el polímero adsorbido a la proteína, al menos bajo condiciones moderadas de pH y fuerza iónica. Los derivados podrían ser utilizados en reacciones donde la estabilidad frente a disolventes orgánicos es un factor limitante (Fernandez-Lafuente, Rosell et al. 1999).

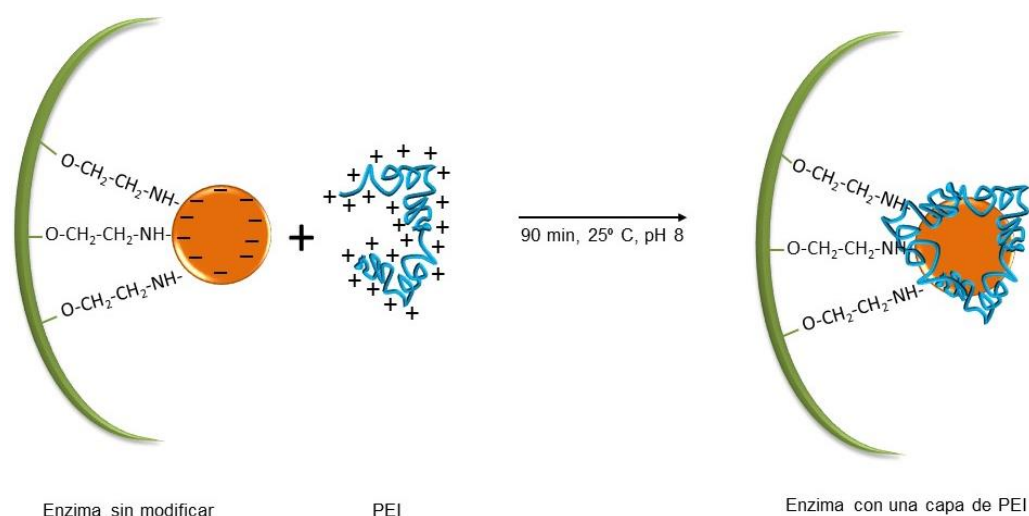


Figura 16 – Modificación con PEI de la superficie de un derivado inmovilizado.

La PEI, *p.e.*, es una poliamina alifática flexible que contiene una alta densidad de grupos cargados positivamente (Bahulekar, Ayyangar et al. 1991) a la cual se le ha atribuido un efecto estabilizador sobre la estructura terciaria de ciertas proteínas (Andersson and Hatti-Kaul 1999).

La presencia de estos polímeros alrededor de la superficie de la enzima y presentando múltiples interacciones con esta, puede tener un doble efecto: La generación de impedimentos estéricos para el movimiento de la estructura de la enzima y la alteración global de las propiedades de la superficie de la enzima.

1.11 Reacciones enzimáticas para la obtención de xilo-oligosacáridos.

Una de las reacciones enzimáticas catalizadas por xilanasas y de gran interés en tecnología de los alimentos es la obtención de xilo-oligosacárideos. Como ya se ha mencionado anteriormente, los XOS son azúcares no convencionales (oligómeros formados por unidades de xilosa), ya que no son calóricos y no son metabolizados por el organismo humano. Se consideran prebióticos, ya que promueven selectivamente el crecimiento de microorganismos como *Lactobacillus sp.* y *Bifidobacterium bifidum*, promoviendo una serie de beneficios a la salud humana, como la reducción de la constipación intestinal, la promoción de la digestión y la absorción de nutrientes, la prevención de infecciones gastrointestinales y la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos (Ragagnin de Menezes and Durrant 2008).

Métodos químicos y enzimáticos constituyen dos alternativas para la obtención de XOS a partir de fuentes materiales lignocelulósicas (LCM) (fuentes altamente disponibles y de bajo costo) como los residuos forestales y agroindustriales. En consecuencia de la ingestión de estos compuestos, se atribuyen diversos efectos beneficiosos a la salud, como por ejemplo la prevención de caries, la disminución de los niveles séricos de colesterol total y de lípidos y el estímulo del crecimiento de bifidobacterias en el tracto digestivo.

Los materiales típicos para la producción de los XOS proceden de una base rica en xilano, con algunas cadenas heterocíclicas de ester, debiendo ser hidrolizada para generar compuestos degradados de cadena larga (Eneyskaya, Ivanen et al. 2007). Estos compuestos pueden ser producidos de las siguientes maneras:

- a través del tratamiento con enzimas nativas del xilano contenido en las LCM;
- o del fraccionamiento de LCM de xilano aislado o solubilizado, que pueden ser obtenidos:
 - ✓ por la degradación hidrolítica de xilano por adición de enzimas hidrolíticas
 - ✓ por la degradación hidrolítica de xilano por vapor de agua o por soluciones diluidas de ácidos minerales (Vazquez, Alonso et al. 2000).

Para la producción directa de XOS a partir de LCM, es necesario que la fracción de xilano del compuesto sea separada del complejo lignocelulósico. Este proceso es favorecido por la estabilidad del pH de estos polímeros y la fracción solubilizada puede ser recuperada a través del licor del proceso. En estos casos, el material crudo puede ser preparado con agentes oxidantes, sales y alcoholes para remover la lignina.

En el caso del xilano, puede ser solubilizado en un licor cáustico, precipitando en compuestos orgánicos (alcoholes, ácidos o cetonas), seguido de la recuperación de la hemicelulosa disuelta y de sus productos de degradación. Una vez que el xilano ha sido aislado o degradado para dar lugar a la forma soluble, estará listo para su hidrólisis mediante xilanasas (Vazquez, Alonso et al. 2000, Kosugi, Murashima et al. 2002). Para la producción de XOS por enzimas,

son necesarios complejos enzimáticos que contienen exo-xilanasas y / o β -xilosidasas, para evitar la producción de xilosa. Estas enzimas pueden añadirse directamente a la reacción, inmovilizadas o producidas in situ por microorganismos (Beg, Kapoor et al. 2001, Rezende, Barbosa et al. 2002, Xiong, von Weymarn et al. 2004, Yoon, Woodams et al. 2006). A través de estos métodos, se pueden producir largas cadenas de XOS, siendo preferibles para el uso en alimentos las cadenas con grado de polimerización entre 2-4 (Van Loo, Cummings et al. 1999).

En la mayoría de los casos, los XOS pueden obtenerse a través de reacciones con vapor de agua o agua hidróxido catalizada para la degradación de xilano, de acuerdo con el procedimiento conocido como autohidrólisis, hidrotermólisis o agua prehidrolizada (Carvalho, Esteves et al. 2004, Yang, Xu et al. 2005).

2 OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general.

El objetivo principal de la Tesis Doctoral fue el diseño de biocatalizadores muy eficientes de xilanasas para optimizar la producción de xilo-oligosacáridos.

Sobre la base de esta observación, en esta Tesis Doctoral hemos establecido algunos pasos que guiaran nuestra investigación:

- Diferentes xilanasas producen diferentes formas activas con diferentes propiedades;
- Diferentes procesos de inmovilización enzimática en diferentes soportes, producen diferentes interacciones entre soporte y enzima de acuerdo con las características de cada una, promoviendo una mejora de las propiedades catalíticas;
- La modificación adicional de los derivados (tanto química como físicamente) puede alterar sus propiedades y mejorar su estabilidad;
- Reacción de hidrólisis enzimática para comprobar la eficiencia del biocatalizador;
- Análisis de XOS obtenidos y la capacidad del reuso del biocatalizador optimizado;
- Cada reacción enzimática hay que analizarla de acuerdo con todos los parámetros de interés industrial: actividad y estabilidad.

En el diagrama (1) se representa esquemáticamente el conjunto de pasos establecidos para verificar las hipótesis planteadas.

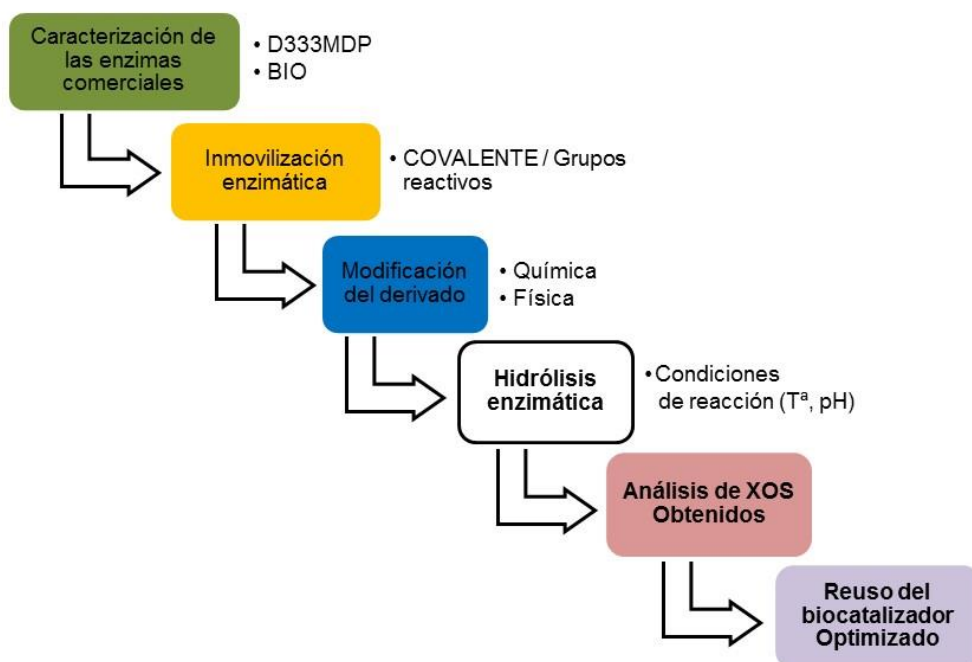


Diagrama 1 – Hipótesis de trabajo de la Tesis Doctoral.

2.2 Objetivos específicos.

La mayoría de las enzimas solubles pueden estabilizarse por diferentes técnicas como la inmovilización y modificaciones químicas, como el recubrimiento de la superficie del derivado con polímeros viscosos.

Cada etapa del proceso planteado en esta Tesis doctoral, fue estudiada teniendo en cuenta las hipótesis planteadas y resumidas anteriormente. Los diferentes objetivos específicos son:

- Evaluación de diferentes enzimas comerciales como biocatalizadores.
- Inmovilización –estabilización de las enzimas comerciales de interés por unión covalente multipuntual. De este modo si la enzima se une al soporte a través de numerosos residuos de su superficie las distancias

relativas de estos residuos han de mantenerse inalteradas frente a cualquier distorsión estructural promovida por cualquier agente inactivante.

- Lograr la inmovilización enzimática covalente multipuntual en un soporte de bajo costo, de modo que el biocatalizador sea más barato.
- Producir una capa protectora para el derivado con la ayuda de polímeros viscosos capaz de proteger la estructura y por ende la actividad de la enzima de posibles agentes desnaturalizantes.
- Producir un biocatalizador capaz de ser estable y reutilizable en las reacciones manteniendo la misma eficiencia.
- Alcanzar el máximo de conversión del sustrato de estudio en xilo-oligosacáridos, obteniendo el mínimo de productos indeseables (xilosa).

3 MATERIALES.

PROVEEDOR	PRODUCTO
ENZIMAS Y DERIVADOS ENZIMÁTICOS	
Fue donada generosamente por Biocatalysts (Wale, UK)	Depol™ 333MDP (D333MDP)
Fue donada generosamente por Biocon (Spain).	Bioxilanasa L Plus (Bioxylanase)
SOPORTES	
Agarose Bead Technologies (Madrid, España)	Agarosa 10 BCL
GE Healthcare (Uppsala, Suecia)	BrCN Sepharose
IONTOSORB Bead Cellulose Derivatives (Ústí nad Labem, República Checa)	Celulosa Macroporosa MT 200
SUSTRATO	
Sigma-Aldrich Chem. Co (St. Louis, MO, USA).	Xilano de beechwood (haya)
Carbosynth limited. Compton, Reino Unido	Xilano de Maíz
PRODUCTOS QUÍMICOS	
Sigma-Aldrich Chem. Co (St. Louis, MO, USA).	Peryodato sódico
	Hidróxido de sodio
	Ácido dinitrosalicílico (DNS)
	Acetato sódico
	Fosfato de sodio
	Glicidol

	EDTA
	1-etil-(dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDC)
	Borohidruro de sódio (NaBH_4)
	Etilendiamina (EDA)
	Polietilenimina (PEI) (PM 1300y 10000, 25000 Da)
	Dextrano (Dx) (PM 1,500, 6,000, 25,000 y 40,000 Da)
	Ácido picrisulfónico
	Metoxipolietilenglicol amina (PEG) 2000Da
Thermo Scientific (Rockford, IL, EEUU)	Reactivo de Bradford
Marcadores Electroforesis	GE Healthcare (Uppsala, Suecia)
EQUIPO	
Sartorius Basic	Balanza
Selecta	Sonicador
Beckman Allegra X-12 Centrifuge	Centrifugas
Hamilton. Slimtrode. Electrodo de pH	pHmetro
Gran JV Nova	Baños
Stuart Roller mixer	Rodillos agitadores
Romero	Campana Flujo laminar
Unitron HT Infors	Shaker
UV mini 1240	Espectrofotómetro

4 MÉTODOS.

4.1 Análisis de proteínas.

4.1.1 Preparación de enzimas para su estudio.

La enzima D333MDP es suministrada como un polvo liofilizado. La enzima fue diluida 1/100 (w / v) en tampón fosfato de sodio 5mM y pH 7, durante 1h con agitación constante a 4° C. Después, la solución enzimática fue centrifugada durante 1 h a 3000 rpm (Beckman Avanti-JA.14). Se obtuvo un precipitado blanco tras la centrifugación, pero al medir la suspensión y el sobrenadante se obtuvo la misma actividad de partida en el sobrenadante por lo que se corroboró que la enzima se encontraba en la porción soluble.

La enzima Bioxilansa se diluyó 1: 100 (v / v) en un tampón dependiendo de la técnica que se vaya a emplear.

4.1.2 Cuantificación de la concentración proteica.

Para llevar a cabo la determinación de la concentración proteica (mg/ml) se empleó el método de Bradford (Bradford 1976). Se preparó una curva de calibración a partir de soluciones a diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA). Para realizar las mediciones se tomó un volumen de 0.8 mL del tampón y se añadieron 0.2 mL del reactivo Bio-Rad para completar un volumen total de 1mL. Se mezcló bien y se dejó reaccionar por 10 minutos para posteriormente leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm. Una vez determinadas las absorbancias de las muestras, se aplicaron los datos obtenidos en la curva de calibración para mostrar los resultados en unidades de masa/volumen.

4.1.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli en 1970 (Laemmli 1970) utilizando geles de poliacrilamida del 12%. Las preparaciones proteicas en su forma soluble fueron hervidas a 100°C durante cinco minutos en tampón de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 2% de sodio-dodecil sulfato (SDS), 5% de β -mercaptoetanol, 10% de glicerol y 0.005% de azul de bromofenol) en una relación 1:1, utilizando alrededor de 200ul. Una vez hervidas las muestras se toma solo el sobrenadante, el cual se aplicaron 10/20ul en cada pocillo del gel y se sometieron las muestras a una potencia de 150v. Para la visualización de las bandas según su peso molecular se tiñeron los geles con azul brillante de Coomassie (Neuhoff, Arold et al. 1988). La anhidrasa carbónica bovina (29 kDa), la albúmina de huevo (45 kDa), la albúmina de suero bovino (66 kDa), la fosforilasa b de conejo (97 kDa), la β -galactosidasa de Escherichia coli (116 kDa) y la miosina del músculo de conejo (200 kDa) se utilizaron como estándares.

4.1.4 Análisis proteómico.

El análisis del peso molecular mediante MS-MALDITOF se llevó a cabo en el CBMSO PROTEIN CHEMISTRY FACILITY, que pertenece a ProteoRed, PRB2-ISCIH, del Centro de Biología molecular Severo Ochoa.

4.1.4.1 Digestión en gel (gel de apilamiento).

El análisis del gel de apilamiento se llevó a cabo en el CBMSO PROTEIN CHEMISTRY FACILITY, que pertenece a ProteoRed, PRB2-ISCIH, del Centro de Biología molecular Severo Ochoa según se describe por (Shevchenko, Wilm et al. 1996, Moreno, Escobar et al. 2014).

4.1.4.2 Cromatografía líquida de fase inversa Análisis RP-LC-MS / MS (modo de exclusión dinámica).

El análisis se llevó a cabo en el CBMSO PROTEIN CHEMISTRY FACILITY, que pertenece a ProteoRed, PRB2-ISCIH, del Centro de Biología molecular Severo Ochoa según se describe por (Alonso, Pisa et al. 2015).

4.2 Determinación de la actividad xilanolítica.

4.2.1 Actividad endoxilanasas.

La actividad de la xilanasas se midió de acuerdo con la metodología de (Miller 1959). Una mezcla del 4% (m / v) de xilano beechwood (haya), en tampón acetato de sodio 50mM y pH 5,0, se agitó durante dos horas a 25° C y se centrifugó durante 1 hora a 3750 rpm (Beckman Avanti-JA.14) a 20° C. La fracción soluble fue diluida cuatro veces en el mismo tampón y utilizada como sustrato para la determinación de la actividad enzimática. A un volumen de 0,9 ml de sustrato se añadieron 0,1 ml de solución enzimática, convenientemente diluida. La reacción fue conducida a 25 ° C, con agitación constante, durante diez minutos, cuando se añadió 1 ml del reactivo alcalino DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), para la detección del producto. Después de la ebullición durante cinco minutos, se hizo la lectura en espectrofotómetro, en longitud de onda de 540 nm (Figura 17).



Figura 17 - Procedimiento para la medida de la actividad enzimática endoxilanasas.

La curva de calibración, en la que se utilizó xilosa, permitió la obtención de un coeficiente de extinción molar igual a $240 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Una unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima capaz de producir 1 μmol de azúcar reductor (AR) por minuto.

Para calcular la actividad endoxilanasas, la fórmula empleada es:

$$U/ml = \frac{(X/E) * A}{B * C}$$

Donde:

- A: volumen final en ml que se usa en el ensayo;
- E: coeficiente de extinción molar DNS;

- B: tiempo en min que hay que dejar pasar para que tenga lugar la reacción;
- C: cantidad de muestra que se utiliza para la medida de la actividad enzimática;
- X: concentración de azúcares reductores ($y = m * x$) siendo “y” la absorbancia 540nm y “m” la pendiente de la recta;

4.2.2 Actividad exoxilanasas.

Se prepara una mezcla que consta de: 900µl de PNPX (p-nitrofenil β-xilanopiranosido) y 100µl de enzima. A continuación, tomaremos diferentes tubos, añadiendo en cada uno de ellos 1ml de tetraborato potásico. El último paso será añadir a diferentes tiempos 100µl de la mezcla preparada anteriormente.

La enzima degrada el sustrato llamado PNPX, por esta razón se realiza esta mezcla y a continuación, se añade cada cierto tiempo el tetraborato, haciendo que la reacción se pare. Así podremos saber la cantidad de sustrato que la enzima habrá degradado a diferentes tiempos.

Para calcular la actividad β-xilosidasa, la fórmula empleada es:

$$U/ml = \frac{Y * Vf}{E * T * Vm}$$

Donde:

- Y: Pendiente de la recta en absorbancia a 405nm;
- E: coeficiente de extinción molar = $17198 M^{-1}cm^{-1}$;
- T: tiempo en minutos;
- Vf: volumen final = 1 ml;
- Vm: volumen muestra = 0,1 ml;

4.2.3 Actividad específica.

Además de la actividad endo y β -xilosidasa habrá que calcular la actividad específica. Se obtuvo la actividad específica por la razón de las unidades totales de enzima (UI) por miligramos de proteína, con la siguiente fórmula:

$$Act. específica = \frac{Actividad \left(\frac{UI}{ml}\right)}{concentración proteica \left(\frac{mg}{ml}\right)} = U/mg$$

4.3 Preparación de los soportes de inmovilización.

4.3.1 CNBr.

El soporte de agarosa activado con CNBr se preparó de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Un gramo de gel de agarosa activado con CNBr fue mezclado en 100 ml de agua, a pH 2,0-3,0. La suspensión se agitó durante 90 minutos y se secó. El gel fue utilizado como control, ya que la inmovilización de las enzimas al soporte ocurre, en suaves condiciones, para formar mayoritariamente conexión de tipo unipuntual. Por lo tanto, esperamos que este derivado presente una estabilidad cercana a la de la enzima soluble.

4.3.2 Glioxil-agarosa 10 BCL.

El soporte se preparó tal como está descrito por (Guisán 1988), funcionalizando el soporte con grupos glioxil en su superficie que pudieran dar lugar a la formación de enlaces con los grupos amino de la enzima (figura 18). El protocolo de funcionalización del gel consta de dos partes. Primero se activa el gel introduciendo grupos dioles; se añade agua destilada a 105 gr de agarosa hasta completar un volumen de 180ml. A esto se le añade 3,4gr de NaOH (1,7M) en 50 ml de agua destilada, manteniéndolo en frío ya que desprende calor. El

NaOH proporcionará un medio básico para arrancar el protón del OH y favorecer la carga negativa necesaria para que el O⁻ ataque el epóxido del glicidol. Posteriormente se añade 1,425gr de BH₄Na para que no se produzca la rotura del gel. Se añaden 36ml de Glicidol (en exceso) en hielo y gota a gota. El glicidol al ser un epóxido con alcohol, su grupo OH reaccionará con los de la agarosa, pero al ser estos bastante inertes, necesitan NaIO₄ que es un agente oxidante capaz de romper el enlace entre dos carbonos obteniendo los grupos aldehídos que necesitamos. La oxidación puede ser cuantificada por consumo del peryodato. Se deja la mezcla en agitación durante 15-18 horas y se lava con agua destilada. Ahora tenemos la agarosa activada con dioles.

La segunda parte consiste en la oxidación hasta aldehídos. Para ello se añaden 3,21gr de NaIO₄ disueltos en agua destilada y luego 1500ml de agua destilada (relación 1:10 con el gel). Se deja oxidar 2horas y se vuelve a lavar con agua destilada.

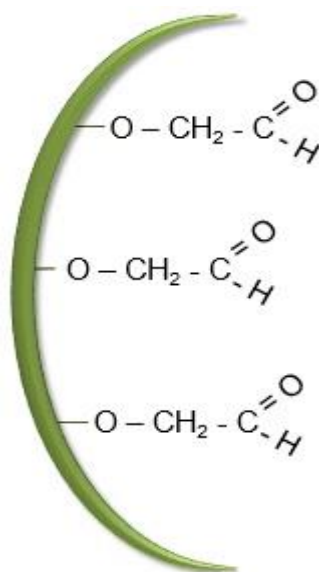


Figura 18 – Representación del soporte glioxil-agarosa, conteniendo grupos aldehídos alifáticos.

4.3.3 Glioxil-Celulosa.

El soporte se preparó y fue activado tal como se describió anteriormente para agarosa 10BCL en el apartado 4.3.2.

4.4 Inmovilización enzimática.

Los rendimientos (%) de inmovilización, a los tiempos fijados, se calcularon comparando la actividad (absorbancia medida a 540nm con el tiempo, es decir, pendiente) de una suspensión de referencia (la enzima soluble o blanco, bajo exactamente las mismas condiciones de inmovilización) y la actividad del sobrenadante, bajo estas condiciones de inmovilización. Para calcular el % de inmovilización, la fórmula empleada es:

$$\% \text{ inmov} = 100 - \left(\frac{\text{sobrenadante} \times 100}{\text{blanco}} \right)$$

La actividad recuperada de la enzima inmovilizada, se define como la diferencia entre la pendiente (absorbancia medida a 540nm con el tiempo) de la suspensión de referencia (blanco) y la absorbancia de la suspensión (soporte) y sobrenadante en las condiciones establecidas. En este caso, la fórmula empleada es:

$$\% \text{ Act. recuperada} = \left(\left(\frac{\text{suspensión}}{\text{blanco}} \right) - \left(\frac{\text{sobrenadante}}{\text{blanco}} \right) \right) \times 100$$

La actividad expresada se define como la actividad recuperada sobre el soporte sólido después del proceso de inmovilización. En momentos diferentes, se retiraron muestras de sobrenadante, suspensión y la solución de enzima de referencia (blanco) y se ensayó la actividad enzimática para el cálculo de ambos parámetros.

4.4.1 Inmovilización covalente.

4.4.1.1 Unipuntual sobre soporte agarosa activados con grupos bromuro de cianógeno (CNBr).

Se diluyeron un total de 100 UI de proteína en un tampón de fosfato de sodio 5 mM a pH 7 y se incubaron con 1 g de soporte. La suspensión se dejó reposar bajo agitación suave durante 15 minutos a 4°C. A continuación, el biocatalizador obtenido se filtró, se lavó con fosfato sódico 10 mM a pH 7 y se incubó durante 2 h en etanolamina 1 M a pH 8 para bloquear cualquier grupo restante de bromuro de cianógeno. Finalmente, el biocatalizador resultante se lavó con fosfato de sodio 10 mM a pH 7 y se almacenó a 4°C hasta su uso.

4.4.1.2 Multipuntual sobre soporte agarosa y celulosa activados con grupos glioxil.

Después de funcionalizar los soportes, se diluyeron un total de 100 UI de proteína en un tampón de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10 y se incubaron con 1 g de. Las suspensiones se incubaron a temperatura ambiente (ajustada a 25°C) bajo agitación suave. Después de diferentes periodos de tiempo, se midió la actividad enzimática en el sobrenadante y la suspensión. Se incluyeron blancos (que es la misma enzima a ser inmovilizada, pero sin soporte) como controles para los procesos de inmovilización. Después de la inmovilización, los derivados se redujeron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 1 mg / ml de borohidruro sódico en presencia de una solución acuosa de xilano de madera de haya al 1% (p / v). Finalmente, el derivado se filtró, se lavó abundantemente con agua y se almacenó a 4° C hasta su uso.

4.5 Modificación físico-química de las enzimas inmovilizadas.

4.5.1 Aminación química (AMN).

La superficie de la enzima inmovilizada se aminó químicamente de acuerdo con un protocolo previamente descrito (López-Gallego, Montes et al. 2005). Se añadió 1 g de enzima inmovilizada a una solución de 10 ml que contenía EDA 1 M a pH 4,75. Se añadió EDAC sólido a una concentración final de 10 mM, con el fin de obtener biocatalizadores inmovilizados totalmente aminados. Después de 90 minutos de agitación suave a temperatura ambiente, los biocatalizadores aminados inmovilizados se filtraron a vacío y se lavaron con un exceso de agua destilada.

Con el fin de verificar la correcta aminación de los biocatalizadores aminados inmovilizados, se suspendieron 50 mg de cada uno en 400 µl de un tampón de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10 y se añadieron 100 µl de ácido picrisulfónico.

Después de 10 min de agitación suave a temperatura ambiente, las suspensiones se filtraron, se lavaron tres veces con una solución saturada de NaCl y una vez con un tampón bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10. Finalmente, se observó la intensidad de color de cada biocatalizador aminado inmovilizado; aquellos que presentan una aminación completa presentan una coloración naranja intensa frente a una coloración amarilla pálida de aquellos sin aminorar.

4.5.2 Modificación con polímeros viscosos.

4.5.2.1 Polietilenimina (PEI).

El biocatalizador inmovilizado se modificó con PEI de diferentes pesos moleculares: 1.300, 10.000 y 25.000 Da. Se suspendió un gramo de

los derivados de glioxil inmovilizados en 20 ml de una solución de PEI al 5% (p / v) preparada en tampón de fosfato 0,025 M pH 8,0. Después de 90 minutos de agitación suave a temperatura ambiente, los derivados se lavaron abundantemente con agua destilada, se filtraron al vacío y se almacenaron a 4°C.

4.5.2.2 *Dextrano (Dx).*

Se diluyó un total de 10,02 g de dextrano en 300 ml de agua destilada. Con el fin de modificar este polímero hasta el 100% de grupos aldehído, se oxidó completamente mediante la adición de 26,16 g de peryodato sódico. Después de 90 minutos de agitación suave a temperatura ambiente, la mezcla se dializó contra 2 L de agua destilada (Moreno-Pérez, Orrego et al. 2016). A continuación, para el ajuste del pH, se mezclaron los 300 ml de solución dializada con 300 ml de tampón de fosfato sódico 100 mM pH 7 para el derivado inmovilizado y AMN y pH 8,5 para el derivado inmovilizado y con capa de PEI. Se añadió 1 g de biocatalizador, aminado o con una capa de PEI, a 10 ml de solución de dextrano-aldehído. Después de 16 h de agitación suave a 4 ° C, el derivado inmovilizado AMN-Dx y PEI-Dx se filtró, lavo y almacenaron a 4° C. El procedimiento se realizó con Dx PM 1.500, 6.000, 25.000 y 40.000 Da.

4.5.2.3 *Metoxipolietilenglicol amino 2000Da (PEG).*

Se añadió un gramo del biocatalizador AMN-Dx o PEI-Dx a 15 ml de una solución de metoxipolietilenglicol amino 2000 Da 3,32 M y bicarbonato 100 mM, pH 8,5. Después de una noche de agitación suave a 4°C, se redujeron en presencia de 1% (p / v) de sustrato (xilano) a pH 8,5 con borohidruro de sodio sólido (1mg/ml) durante 30 minutos a 25 ° C.

Finalmente, se lavaron con alrededor de 100 ml de agua destilada y se almacenaron a 4°C (Moreno-Pérez, Orrego et al. 2016).

Los derivados modificados finales en todos los casos se conservaron el 100% de la actividad inicial cuando se compararon con la actividad de la xilanasa soluble.

4.6 Estabilidad térmica de las enzimas inmovilizadas y modificadas.

La estabilidad enzimática se analizó para diferentes condiciones de pH (7 y 10) y temperatura (60 y 25°C). Los derivados fueron suspendidos en tampón, en una proporción óptima y previa prueba de su linealidad espectrofotométrica.

Como protocolo general, a diferentes intervalos de tiempo se tomaron las muestras necesarias para realizar el ensayo de actividad enzimática (según se ha descrito en apartado 4.2) y se comparó con la actividad a tiempo inicial.

Como sustrato se utilizó xilano de beechwood o haya (conforme lo descrito en el apartado 4.2.1).

4.7 Reacciones enzimáticas catalizadas por xilanasa.

4.7.1 Hidrólisis enzimática de xilano.

Se añadió 0,1 g de biocatalizador inmovilizado a 10 ml de una preparación de sustrato (madera de haya 4% (p / v) en agua destilada con azida sódica al 0,05%). La mezcla de reacción se dejó reposar bajo agitación suave a 50°C y pH 5,5 hasta que se alcanzó la liberación máxima de azúcares reductores. Se retiraron las muestras y se determinó la liberación de azúcares reductores en diferentes tiempos fijados como se ha descrito anteriormente en el apartado 4.2. Cuando la producción de azúcares reductores se hizo constante, el biocatalizador inmovilizado se filtró y se lavó.

4.8 Reutilización de los biocatalizadores.

El ensayo de reciclado se realizó en las mismas condiciones que se describieron anteriormente en el apartado 4.7.1. Entre cada ciclo de reacción, el biocatalizador inmovilizado se recuperó fácilmente y se lavó con un tampón de acetato de sodio 25 mM a pH 5,5, y a continuación se añadió una nueva solución de sustrato para un nuevo ciclo.

4.9 Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento acoplado con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).

Las muestras fueron analizadas gracias a la colaboración del laboratorio de Biocatálisis Aplicada (ABG), dirigido por el Dr. Francisco José Plou Gasca.

El contenido de XOS de muestras tomadas en diferentes puntos temporales de la reacción de hidrólisis de xilano se analizó mediante HPAEC-PAD. El análisis de XOS se llevó a cabo en un sistema ICS3000 Dionex consistente en una bomba de gradiente SP, un muestreador automático AS-HV y un detector electroquímico con un electrodo de trabajo de oro y Ag / AgCl como electrodo de referencia. Se utilizó una columna de intercambio aniónico de 3 x 250 mm Carbo-Pack PA-200 (Dionex) a 30°C. El caudal fue constante a 0,5 ml / min durante todo el análisis. La fase móvil inicial fue NaOH 15 mM durante 12 min. A continuación, se aplicó un gradiente (8 min) de NaOH 15-75 mM y de acetato de sodio 0-80 mM. A continuación, se varió la composición de fase móvil de 75 mM a 100 mM de NaOH y de 80 mM a 320 mM de acetato de sodio durante 10 min. Los picos se analizaron utilizando el software Chromeleon. La identificación y cuantificación de XOS lineal se realizó utilizando estándares comerciales (Megazyme). Todas las muestras fueron previamente filtradas a través de filtros de nylon de 0,45µm y convenientemente diluidas con H₂O.

4.9.1 Análisis de los resultados.

Los ensayos fueron realizados con una desviación estándar del 5%.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Caracterización de endoxilasas comerciales.

El hongo filamentoso *Trichoderma reesei* (anamorfo *Hypocrea jecorina*) es uno de los mejores productores de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, produciendo todas las enzimas necesarias para la degradación de celulosa y hemicelulosa (Biely and Tenkanen 1998). Varias preparaciones de enzimas comerciales se fabrican actualmente utilizando cepas de *T. reesei* (Tenkanen, Vršanská et al. 2013).

Las xilasas presentan un amplio rango de pH para su acción (Manrich, Komesu et al. 2010). D333MDP y BIO son cócteles enzimáticos comerciales con alta actividad pentosanasa/hemicelulasa basada en *T. reesei* como plataforma productora, que tiene la xilasa como principal actividad enzimática. Según los proveedores, ambos cócteles presentan enzimas con un rango de pH óptimo entre 4.0-6.0 y rango de temperatura óptima entre 50-60° C, por eso, antes de la inmovilización, se ensayó la estabilidad de ambas xilasas solubles bajo las condiciones de inmovilización, pH 10 y 25°C. Los dos cocteles, D333MDP y BIO, fueron estables en estas condiciones experimentales (no se muestra los datos).

Una caracterización previa de los cócteles enzimáticos es esencial para evaluar las diferencias en su concentración de proteína, pureza, la presencia de diferentes enzimas xilanolíticas, así como sus proporciones en cada muestra.

5.1.1 Endoxilasa comercial Depol™ 333MDP (D333MDP) y Bioxilasa L Plus (Bioxilasa).

La preparación de D333MDP presentó 5,45 U / mg prot, mientras que Bioxilasa presentó 32,63 U / mg prot. SDS - PAGE reveló que D333MDP está compuesto principalmente por una proteína con 21 kDa. Por el contrario, la

Bioxilanasas es una preparación más compleja compuesta por la misma proteína de 21 kDa y también por otras con 38, 43 y 65 kDa.

Muestras de las dos enzimas fueran enviadas para un análisis más específico en ProteoRed – Plataforma en red de proteómica Carlos III, del Instituto Centro de Biología Molecular Severo Ochoa – CBMSO. En el análisis LC-MS/MS de las muestras se obtienen abundantes espectros de fragmentación de muy buena calidad y se identifica un número moderado de péptidos y proteínas. En la muestra Bioxilanasas se identifica con mayor Score Endo 1,4-beta-xylanase 3 de *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), y cuyo PM es de 38,1 kDa (Figura 19).

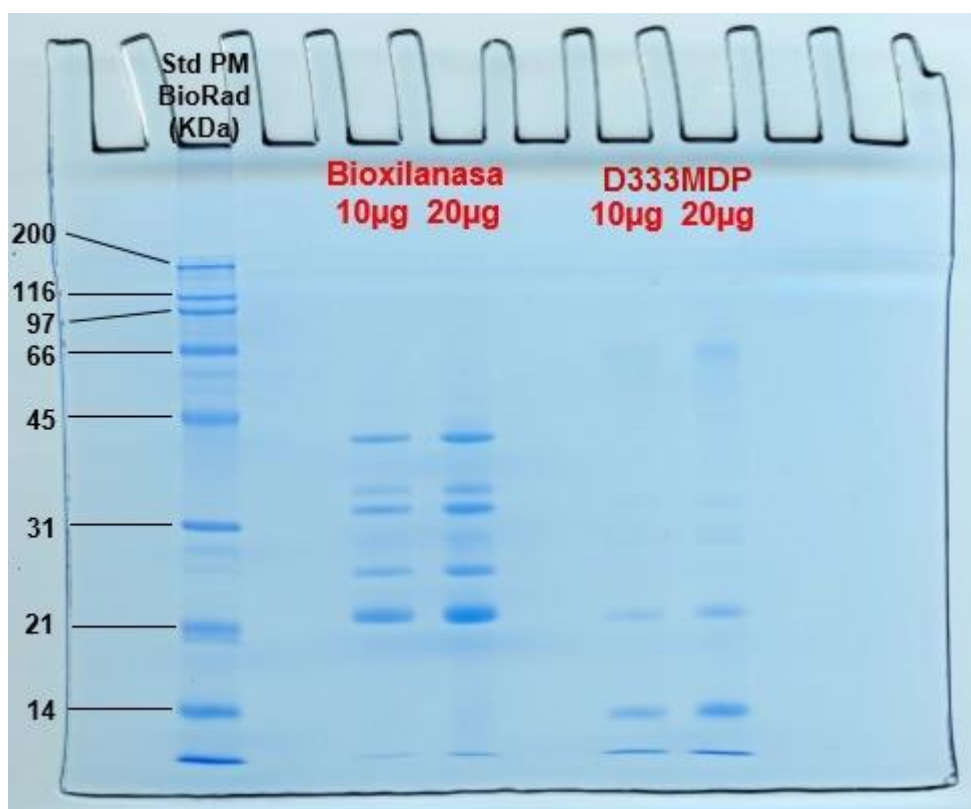


Figura 19 - Perfiles SDS-PAGE de los cócteles enzimáticos D333MDP y Bioxilanasas. Carril 1: los estándares de proteína de peso molecular fueron α -lactalbúmina (14,4 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), ovoalbúmina (45

kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), fosforilasa b (97 kDa); Carril 2 y 3: Bioxilanasas soluble (10µg y 20 µg); Carril 2 y 3: D333MDP soluble (10µg y 20µg) (Fuente: ProteoRed).

La proteína principal presentada en ambos cócteles mostró el mismo PM descrito para Xyn II de *T. reesei* (Törrönen, Mach et al. 1992). Además, este hongo también produce otras xilanasas como Xyn III y Xyn IV, que presentan PM de 38 y 43 kDa, respectivamente (Matsuzawa, Kaneko et al. 2016). Sin embargo, según el fabricante (Biocon), la proteína de 65 kDa se refiere a una enzima de acceso con actividad de α -L-arabinofuranosidasa.

5.2 Estudio de la inmovilización-estabilización de la endoxilanasas comercial D333MDP.

Para intentar inmovilizar covalentemente nuestra enzima de interés y aumentar su estabilidad para su uso industrial, D333MDP se inmovilizó en perlas de agarosa que se activaron con grupos bromuro de cianógeno (CNBr) o grupos glioxil (Ag-G). Fue ofrecido 1,08 mg de proteína de la enzima D333MDP por g soporte (100U/g soporte).

5.2.1 Soporte CNBr.

La unión covalente unipuntual se llevó a cabo en CNBr. En este caso, en sólo 15 minutos, se obtuvieron un rendimiento de inmovilización de 16%, recuperándose el 17% de la actividad enzimática inicial.

5.2.2 Soporte agarosa 10 BCL activada con grupos glioxil.

Se inmovilizó D333MDP en condiciones alcalinas sobre agarosa altamente activada con grupos glioxil (Ag-G), donde la enzima se inmovilizó a través de las regiones superficiales más ricas en lisinas obteniendo una unión covalente multipuntual muy intensa (Fernandez-Lorente, Lopez-Gallego et al. 2015).

Para llevar a cabo este protocolo de inmovilización, la enzima D333MDP se disolvió en tampón de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10 y esta solución se añadió al soporte e incubó a 25°C, según el método descrito en el apartado 4.4.1.2 (1,08 mg proteína o 100 U/g soporte). De esta manera, después de 24 horas de incubación a un pH alcalino, D333MDP inmovilizado sobre Ag-G (Ag-G-24h) expresó 86,3% de la actividad enzimática inicial y el rendimiento de inmovilización fue 66% después de una reducción con borohidruro de sodio (tabla 1), dando como resultado un derivado con 0,718 mg de proteína/g soporte (66 U/g soporte).

Los grupos glioxil son muy estables a pH 10 permitiendo incubaciones durante largos periodos de tiempo entre la enzima inmovilizada y el soporte activado que promueve un enlace covalente multipuntual muy intenso. Esta intensa unión covalente multipuntual puede aumentar la rigidez de la enzima inmovilizada, induciendo así una mayor resistencia a pequeños cambios conformacionales causados por calor, disolventes orgánicos, desnaturalizantes, etc. (Fernandez-Lorente, Lopez-Gallego et al. 2015).

Debido a este hecho, hemos tratado de optimizar el protocolo de inmovilización aumentando el tiempo de incubación en condiciones alcalinas. Así, la enzima se incubó durante 72 h en presencia de glioxil agarosa (Ag-G-72h) bajo las mismas condiciones anteriores. En este caso, Ag-G-72h expresó un 35% de su actividad inicial y el rendimiento de inmovilización fue 69% (tabla 1). En este caso particular, tiempos de incubación más prolongados en condiciones alcalinas afectaron negativamente a la actividad expresada debido a la rigidización más intensa de la estructura terciaria de la enzima que pudo dar lugar a una distorsión de la misma y su pérdida de actividad.

Tabla 1 – Rendimiento de Inmovilización y actividad recuperada del derivado (D333MDP inmovilizado en soporte glioxil agarosa 10 BCL) para los tiempos de incubación experimentados para llevar a cabo posteriormente la hidrólisis de xilano.

Tiempo	24 h Incubación		72 h Incubación	
	100 U/g		100 U/g	
	% Inmov.	% Act. Rec.	% Inmov.	% Act. Rec.
	0	0	0	0
1 h	30,5	18,8	22,0	20,3
2 h	25,0	24,5	33,9	22,5
5 h	45,1	42,1	43,7	44,7
24 h	66	86,3	67,6	86,9
48 h	-	-	68,9	57,8
72 h	-	-	69	35

5.2.3 Estabilización de la xilanasa comercial D333MDP.

Los biocatalizadores inmovilizados fueron inactivados térmicamente por incubación a 50°C y pH 5.5 y pH 7 para evaluar su estabilidad térmica. Como era de esperar, los biocatalizadores inmovilizados mostraron diferentes estabilidades térmicas dependiendo del protocolo de inmovilización. El factor de estabilización más alto se logró para los biocatalizadores inmovilizados en Ag-G.

En las primeras condiciones estudiadas, pH 7 y 50°C (Figura 20), ambos biocatalizadores inmovilizados en Ag-G, el incubado durante 24 h y durante 72 h, mostró estabilidad similar utilizando estas condiciones experimentales. La semivida de estos biocatalizadores inmovilizados fue de 96 h, mientras que la vida media del biocatalizador inmovilizado con CNBr y la enzima soluble fueron de 44 y 16 horas, respectivamente.

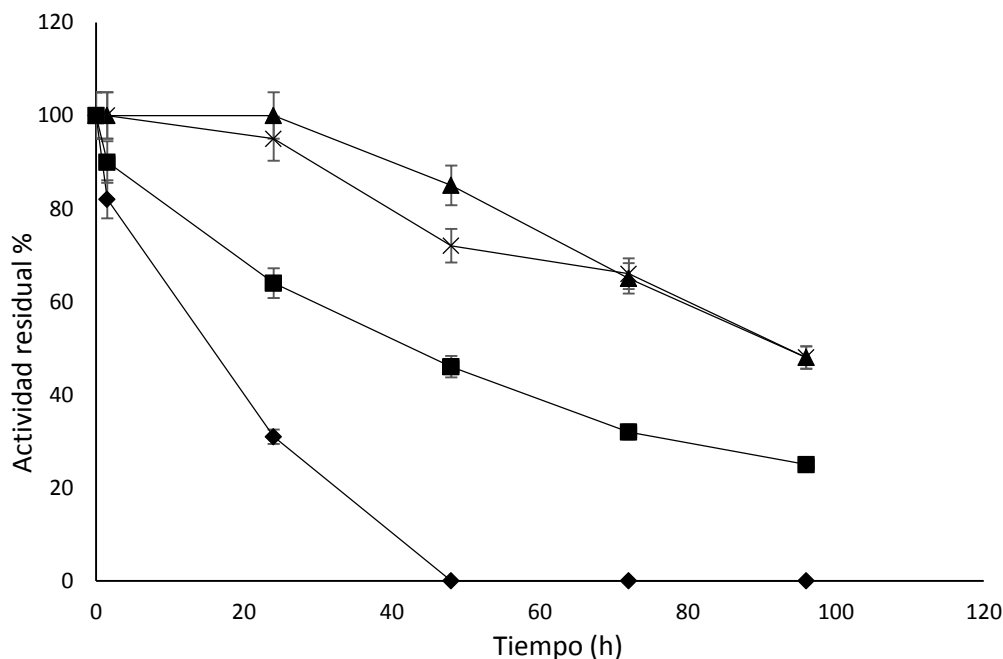


Figura 20 - Estabilidad D333MDP - pH7 50 ° C: Efecto del pH en el perfil del derivado D333MDP y la enzima soluble. Los experimentos se realizaron a 50°C pH 7 usando xilano de haya como sustrato. El derivado se diluyó en una solución de tampón fosfato sódico 25 mM. Enzima soluble (◆) Ag-G 24h (▲) Ag-G 72h (×) BrCN (■).

Los mismos biocatalizadores inmovilizados se incubaron en 25 mM de un tampón de acetato sódico a pH 5,5 y 50° C. La enzima soluble sólo mostró 11% de su actividad inicial después de 24 horas de incubación, mientras que el biocatalizador Ag-G-24h retuvo el 83% de su actividad catalítica inicial después de 120 horas en las mismas condiciones (Figura 21). Por el contrario, el biocatalizador Ag-G-72h mostró 60% de su actividad inicial después del mismo período en las mismas condiciones. Por el contrario, la enzima soluble y el biocatalizador CNBr produjeron un comportamiento muy similar con una vida media de 3 h. Por lo tanto, CNBr inmovilizado por un sólo punto exhibió la misma rigidez que la enzima soluble.

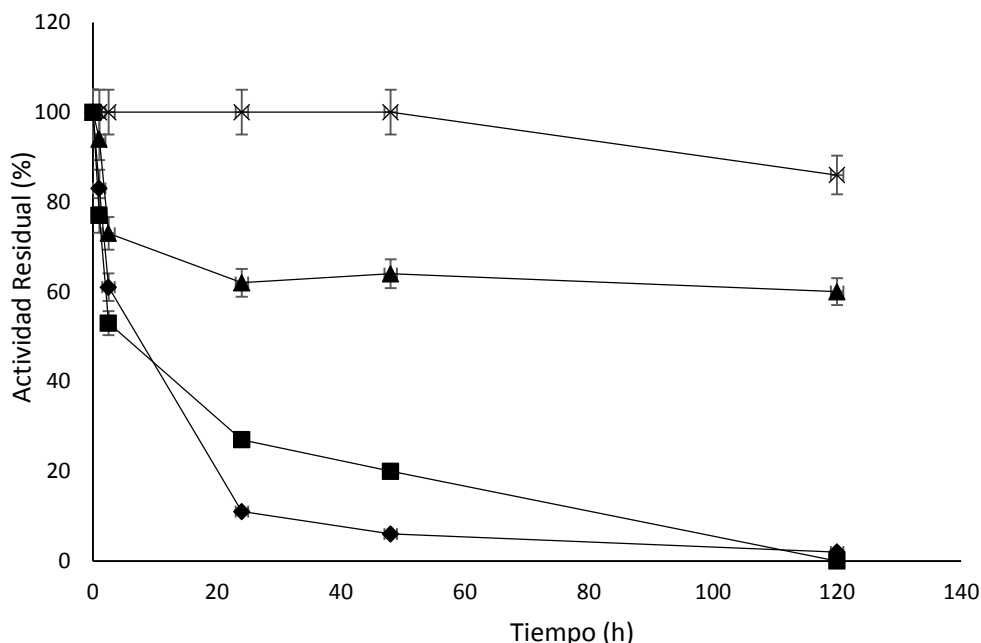


Figura 21 - Estabilidad D333MDP - pH 5.5 50 ° C: Efecto del pH en el perfil del derivado D333MDP y la enzima soluble. Los experimentos se realizaron a 50°C pH 5,5 usando xilano como sustrato. El derivado se diluyó en una solución de tampón 25 mM de acetato. Enzima soluble (◆) Ag-G 24h (▲) Ag-G 72h (×) BrCN (■).

El pH del medio es un factor determinante clave para la actividad enzimática. Además, las enzimas pueden experimentar cambios estructurales variando el pH, y los cambios extremos pueden alterar la estructura de las enzimas y llevar a la desnaturalización. Según el trabajo previamente descrito (Collins, Gerday et al. 2005, Lafond, Tauzin et al. 2011), el intervalo óptimo de pH de la xilanasa varía entre 4 y 7, y la mayoría de las xilanasas pierden su actividad catalítica a valores de pH superiores a 7. En el caso de la estabilidad en condiciones ácidas para Ag-G-72h, el biocatalizador inmovilizado mostró una mayor estabilidad frente al mismo biocatalizador incubado 24 h a un pH más alcalino.

La enzima soluble, en ambas las condiciones probadas, presenta una inactivación térmica muy rápida. Eso puede ser justificado debido a que la enzima puede ser fuertemente atacada por los agentes desnaturalizantes y al estar

disuelta en el medio de reacción, puede perder totalmente su actividad en poco tiempo de incubación.

Con el derivado inmovilizado en BrCN, el motivo de su rápida inactivación es que por ser una inmovilización de unión unipuntual, el derivado posee bajo carga enzimática con baja rigidez en la unión enzima soporte, haciendo que sea un biocatalizador de baja estabilidad.

Para muchas enzimas, se ha descrito un aumento en el tiempo de incubación como un factor capaz de aumentar la estabilidad térmica promoviendo una unión covalente multipuntual que rigidifica intensamente la estructura terciaria (Blanco, Calvete et al. 1989, Bolivar, Wilson et al. 2006, Rocha-Martín, Vega et al. 2012). En este caso particular, las diferencias observadas con respecto a la estabilidad a pH 5,5 entre los biocatalizadores Ag-G-24h y Ag-G-72h pueden explicarse por el efecto positivo de una unión covalente multipuntual más intensa entre la enzima y el soporte logrado por el tiempo mayor de incubación, y los cambios estructurales de la enzima a este pH, debido al aumento de rigidificación. A la luz de estos resultados, se seleccionó D333MDP inmovilizado en Ag-G durante 24 horas bajo condiciones alcalinas como biocatalizador óptimo por ser el biocatalizador más activo, y se utilizó para experimentos adicionales.

5.2.4 Aminación química de la superficie de la enzima D333MDP inmovilizada en soporte glioxil-agarosa.

D333MDP inmovilizada en condiciones óptimas (Ag-G-24h) se modificó químicamente usando este método (apartado 4.5.1). La actividad enzimática del biocatalizador inmovilizado aparentemente no fue afectada por este tratamiento (la actividad enzimática fue del 100% después de la aminación química en condiciones estándar, véase 4.2). Después de la aminación química del biocatalizador Ag-G-24h, se estudió la estabilidad térmica a pH 7 del biocatalizador aminado (Ag-G-24h-AMN) y no-aminado (Ag-G-24h) (Figura

22). A pH 7 y 50°C, ambos biocatalizadores, Ag-G-24h y Ag-G-24h-AMN, tuvieron una semivida de aproximadamente 90 horas.

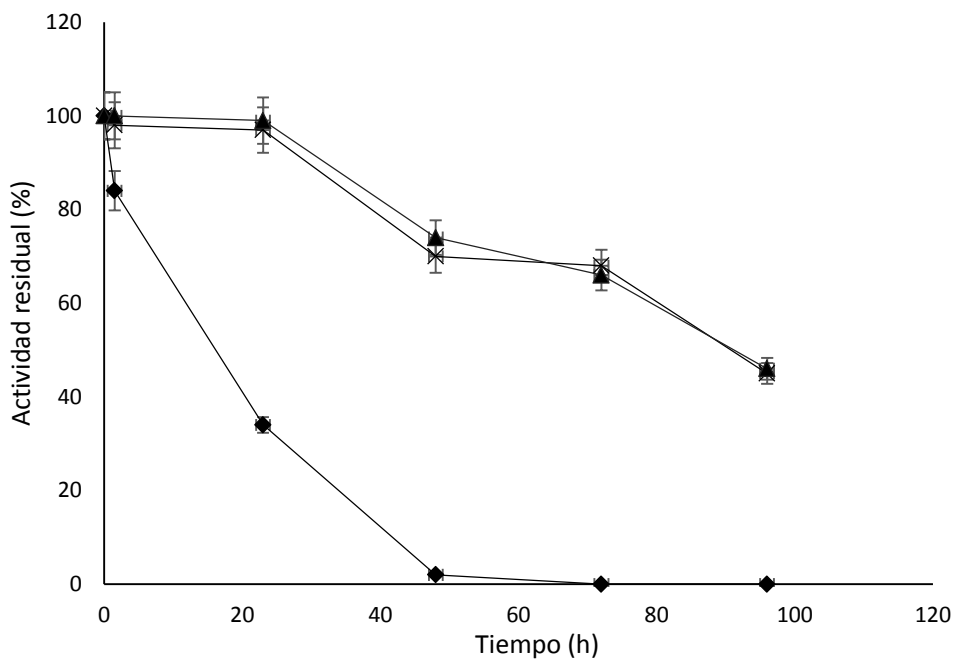


Figura 22 - Estabilidad D333MDP AMN - pH7 50° C: Efecto de la aminación química en el derivado de Ag-G 24 h. Los experimentos se realizaron a 50°C pH 7 usando xilano como sustrato. El derivado se diluyó en una solución de tampón fosfato sódico 25 mM. Enzima soluble (◆) Ag-G 24h (×) Ag-G 24h AMN (▲).

Cuando se estudió el efecto de la aminación química sobre la actividad catalítica y la estabilidad térmica a pH 5,5, la aminación completa del biocatalizador inmovilizado parecía tener un efecto positivo sobre ambas características del biocatalizador Ag-G-24h. Con respecto a la estabilidad térmica a pH 5,5, el biocatalizador aminado Ag-G-24h retuvo el 97% de su actividad catalítica inicial después de la incubación durante 120 horas (figura 23). Bajo las mismas condiciones, Ag-G-24h retuvo el 83% de su actividad catalítica inicial después del mismo período de incubación (figura 23).

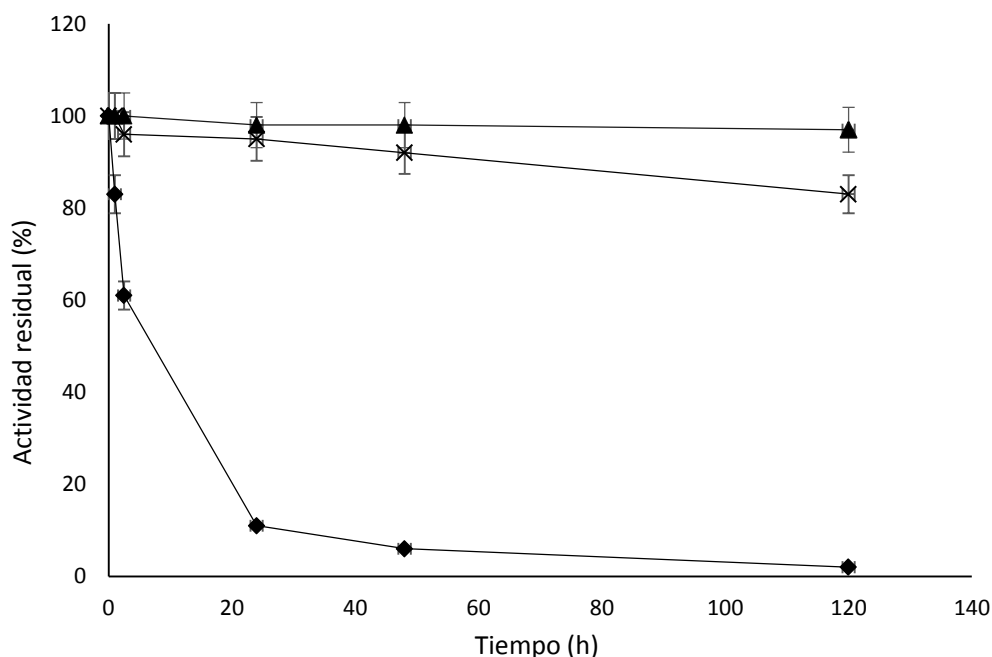


Figura 23 - Estabilidad D333MDP AMN - pH5,5 50 ° C: Efecto de la aminación química sobre el perfil de Ag-G 24 h. Los experimentos se realizaron a 50°C pH 5,5 usando xilano como sustrato. El derivado se diluyó en una solución de tampón acetato 100 mM. Enzima soluble (◆) Ag-G 24h (×) Ag-G 24h AMN (▲).

La aminación química de los grupos carboxílicos de la superficie de la enzima promueve cambios en las propiedades físicas de la superficie de la xilanasas, alterando sus propiedades tales como el perfil de actividad / pH y aumentando la estabilidad enzimática (Rodrigues, Barbosa et al. 2014). Esto podría explicar la considerable mejora de la estabilidad y la conservación de la actividad enzimática a pH 5,5 que mostró el biocatalizador aminado Ag-G-24h.

5.2.5 Reacción de Hidrólisis de xilano de haya para obtención de XOS.

Los biocatalizadores inmovilizados de D333MDP se evaluaron por su capacidad para liberar azúcares reductores de la reacción de hidrólisis de xilano

de madera de haya. La liberación de azúcares reductores se estudió a pH 5,5 y 50°C con los mejores biocatalizadores estudiados, Ag-G-24h y Ag-G-24h-AMN.

La Figura 24 muestra los resultados de la cinética de hidrólisis de xilano. El biocatalizador inmovilizado Ag-G-24h-AMN consiguió una liberación del 80% de azúcares reductores después de sólo 6 h de reacción y el biocatalizador inmovilizado no aminado alcanzó el 65% después del mismo período. El biocatalizador Ag-G-24h-AMN hidrolizó xilano de madera de haya más eficientemente que el biocatalizador Ag-G-24h, obteniendo un 100% de hidrólisis de xilano en sólo 24 h. Mientras tanto, el Ag-G-24h tardó aproximadamente 120 horas en alcanzar el mismo porcentaje y completar la reacción de hidrólisis.

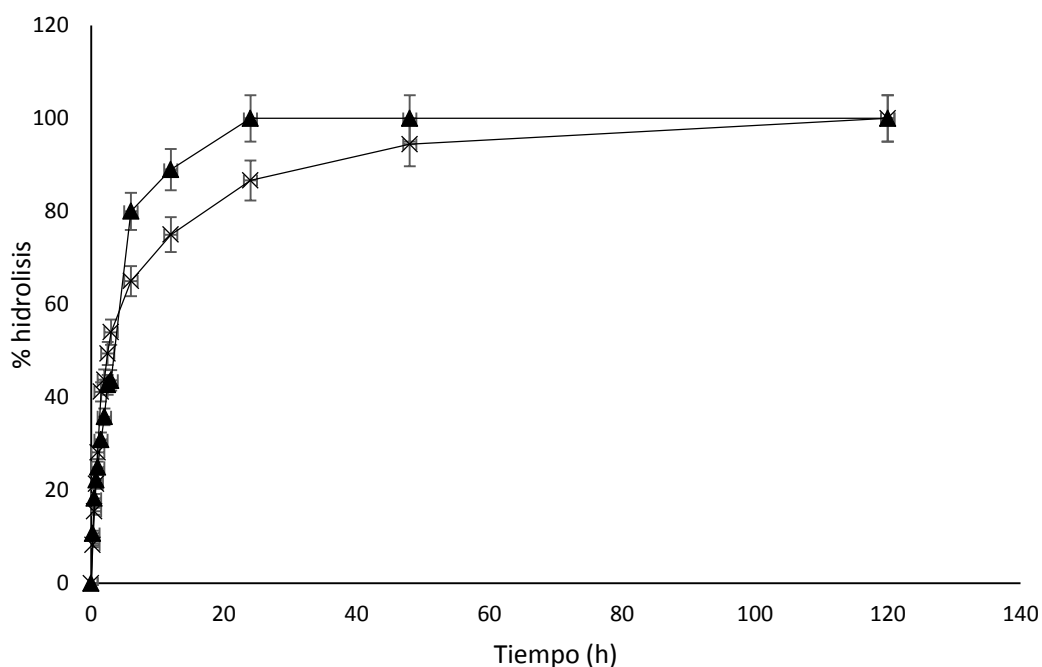


Figura 24 - Curva de hidrólisis de xilano de haya al 4% en agua a 50° C y pH 5,5, usando 1% del derivado de D333MDP, aminado y sin aminar. Ag-G 24h (×) Ag-G 24h AMN (▲).

Viendo estos resultados se puede contemplar que la estrategia de modificación post-inmovilización con la aminación química (Ag-G-24h-AMN) fue muy adecuada para este tipo de reacción para la acción de la enzima, esto se puede deber a que tras introducir más grupos amino la enzima fue más estable frente a las condiciones probadas (pH 5,5 60° C) y así queda protegida por la superficie del soporte previniéndose así la posible interacción de la enzima con los agentes desnaturizante del medio de reacción, lo que concuerda con el estudio de (Rodrigues, Godoy et al. 2009).

5.2.6 Reutilización de los biocatalizadores. Ciclo de reacciones.

Para probar la aplicabilidad de estos biocatalizadores inmovilizados en la industria, se ensayaron los biocatalizadores modificados (Ag-G-24h-AMN) y no modificados (Ag-G-24h) D333MDP durante varios ciclos de reacción de hidrólisis de xilano a 24h, 50°C y pH 5,5 (Figura 25). Durante cuatro ciclos de reacción (etapas de hidrólisis-lavado-hidrólisis en cada ciclo), se confirmó que el Ag-G-24h-AMN era el mejor biocatalizador.

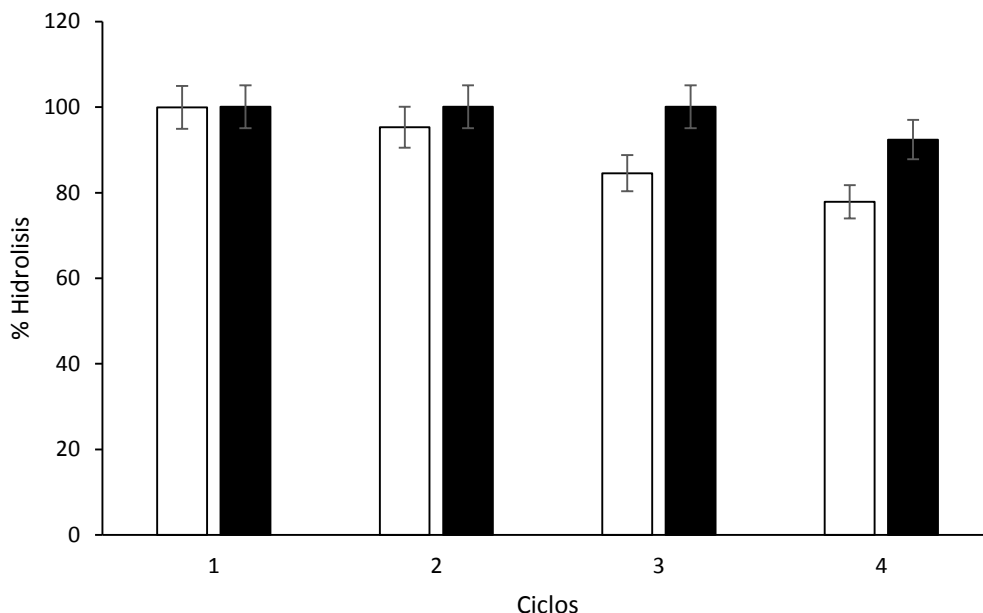


Figura 25 - Ciclos de hidrólisis: ciclos de reacción de hidrólisis de xilano. Las reacciones se realizaron con 4% de xilano comercial en agua usando 0,4% de Ag-G 24 h y Ag-G 24 h AMN a pH 5,5 y 50°C. Ag-G 24h (□) Ag-G 24h AMN (■).

A lo largo de cuatro ciclos probados, Ag-G-24h-AMN logró una liberación de más del 90% de azúcares reductores. Por el contrario, después del segundo ciclo, el biocatalizador Ag-G-24h, mostró un menor grado de liberación de azúcares reductores, alcanzando el 77% en el cuarto ciclo. Por lo tanto, la aminación química fortaleció la capacidad de resistencia del biocatalizador, mejorando así su actividad catalítica y estabilidad térmica.

Es normal que dure el catalizador Ag-G-24h-AMN más ciclos ya que era más estable como ya se había demostrado anteriormente en los apartados 5.2.3 y 5.2.4, donde la enzima inmovilizada y aminada fue más termoestable, frente a la enzima solo inmovilizada, en las mismas condiciones.

5.2.7 Análisis de los XOS producidos en la reacción de hidrolisis de xilano de haya.

Según el análisis de XOS por HPAEC-PAD, la composición final del producto obtenido después de 24 h de reacción de hidrólisis de xilano que se llevó a cabo utilizando el biocatalizador Ag-G-24h AMN, consistía en 90% de xilobiosa, 5% de xilotriosa y 5 % de xilosa. El biocatalizador Ag-G-24 h no modificado, produjo 88% de xilobiosa, 7% de xilotriosa y 5% de xilosa después de 120 h de hidrólisis (tabla 2).

Tabla 2 - Composición de la mezcla de XOS obtenida de hidrólisis de xilano de madera de haya utilizando biocatalizadores Ag-G-24h y Ag-G-24h AMN.

Biocatalizadores	Tiempo de reacción (h)	Xilooligosacáridos (%)		
		Xilosa	Xilobiosa	Xilotriosa
Ag-G-24h	120	5	88	7
Ag-G-24h AMN	24	5	90	5

Los resultados se mostraron muy favorables pues lo que nos interesa es producir XOS que pueden ser considerados prebióticos, como es el caso de la xilobiosa, intentando producir el menor porcentaje posible de xilosa.

5.2.8 Conclusión.

La enzima comercial Depol™ 333MDP se inmovilizó con éxito en un soporte de agarosa altamente activado con grupos glioxil. El mejor biocatalizador inmovilizado en cuanto a actividad recuperada se obtuvo después de 24 horas de incubación bajo condiciones alcalinas. Los tiempos de incubación más prolongados bajo condiciones alcalinas no tuvieron un efecto positivo sobre la actividad catalítica ni sobre la estabilidad térmica a pH 5,5. El biocatalizador Ag-G-24h mostró un fuerte aumento en la estabilidad térmica en comparación con la enzima soluble y el biocatalizador CNBr, siendo 60 veces más estable a pH 5,5 y 50°C. Mientras que, el mismo biocatalizador a pH 7 fue 25 veces más estable que la enzima soluble. Además, al combinar la aminación química en la fase sólida de esta endoxilanasas y la inmovilización enzimática, hemos podido aumentar la actividad enzimática y la estabilidad a pH 5,5.

El biocatalizador aminado inmovilizado fue 5 veces más estable en comparación con el biocatalizador inmovilizado no aminado. El biocatalizador aminado mostró una mayor eficiencia en la reacción de hidrólisis de xilano de madera de haya, resultando 5 veces más eficiente que con el biocatalizador inmovilizado no modificado. El biocatalizador aminado se probó exitosamente para realizar 4 ciclos de reacción de hidrólisis de xilano de madera de haya, alcanzando 90-100% de conversión después de 24h de reacción a 50°C. A este tiempo de reacción, la mezcla de XOS obtenida consistió en 90% de xilobiosa y 5% de xilotriosa y xilosa.

De acuerdo con (Aragon, Mateo et al. 2013), el biocatalizador producido a partir de una xilanasas de *S. halstedii* en glioxil-agarosa, produjo un 10% de xilosa después de 140 horas de hidrólisis, con 100% de liberación de AR, utilizando xilano beechwood 4% (m/v).

La enzima D333MDP obtuvo resultados muy importantes en cuanto al uso de xilanasas para producción de XOS. Este grado de conversión de xilano en xilobiosa es muy interesante en términos de la aplicabilidad de esta reacción a escala industrial.

5.3 Estudio de la inmovilización-estabilización de la endoxilanasas comercial bioxilanasas.

BIO se inmovilizó en perlas de agarosa que se activaron con grupos bromuro de cianógeno (CNBr) o grupos glioxil (Ag-G). Fueron ofrecidas 9 mg de proteína de la enzima BIO por g de soporte (100U/g soporte).

5.3.1 Soporte CNBr.

De la misma forma con que fue realizado con la enzima D333MDP, la unión covalente unipuntual con la enzima BIO se llevó a cabo en CNBr. En este caso, en sólo 20 minutos, se inmovilizó un 31% la enzima ofrecida, pero sólo se recuperó el 34% de la actividad enzimática inicial.

5.3.2 Soporte glioxil-agarosa.

Después de 1 h de incubación, BIO mostró un 35% de rendimiento de inmovilización, alcanzando el 87% después de 5 horas. Con 24 h de incubación, se obtuvo 87% de rendimiento de inmovilización y 89,5% de actividad recuperada. Teniendo en cuenta los parámetros de rendimiento y actividad expresada se puede observar que la xilanasas se inmovilizó eficazmente en agarosa 10 BCL activada con grupos glioxil por unión covalente multipuntual. Se observó que los números se mantuvieron constantes después de 5 horas de incubación, y por eso, se realizó un nuevo ensayo, en las mismas condiciones anteriores y se monitorizó durante 48 horas (tabla 3). Con 4 h de incubación, BIO ya presentaba porcentaje de inmovilización y actividad recuperada del 87% y 90%, respectivamente, muy parecidos con los resultados presentados con 24 h de inmovilización. El porcentaje de inmovilización fue constante en las

siguientes horas, pero la actividad recuperada disminuyó. Así, se optó por definir como 4 h el tiempo de inmovilización ideal para los próximos experimentos, dando como resultado un derivado (Ag-G BIO) con 7,83 mg de proteína/g soporte (o 87 U/g soporte).

Tabla 3 – Rendimiento de inmovilización y actividad recuperada del derivado (BIO inmovilizado en soporte glioxil agarosa 10 BCL) para los tiempos de incubación a pH 10 experimentados para llevar a cabo posteriormente la hidrolisis de xilano.

Tiempo	% Inmov.	% Act. Rec.
	0	0
1 h	35	18,8
2 h	25	24,5
3 h	54	52
4 h	87	90
5 h	87	89,5
7 h	86	88,7
24 h	87	89,1
48 h	86	80

5.3.3 Estabilización de la xilanasa comercial Bioxilanasa L Plus.

El derivado de Bioxilanasa (Ag-G Bio) inmovilizado en glioxil-agarosa se incubó en tampón de bicarbonato sódico pH 10,0 a 25° C para evaluar su estabilidad (Figura 26). La bioxilanasa soluble perdió su actividad total después de 48h de incubación a 25° C pH 10,0. El derivado en BrCN alcanzó vida media después de 24h, mientras Ag-G Bio, cuando se incubo en condiciones alcalinas, mostró una vida media de 50 h.

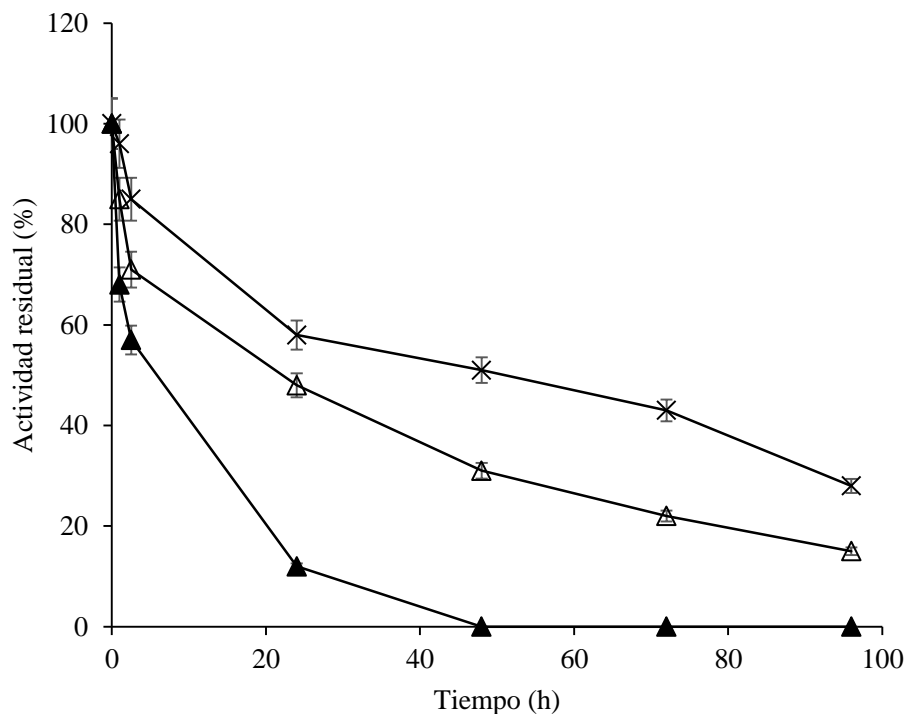


Figura 26 - Estabilidad BIO – pH 10 25° C: Efecto del pH en el perfil del derivado BIO y la enzima soluble. Los experimentos se realizaron a 25°C y pH 10 usando xilano como sustrato. El derivado se diluyó en una solución de tampón bicarbonato de sodio 100 mM. Enzima soluble (▲); BrCN (△) y Ag-G BIO (×).

Hay varios factores que pueden afectar a la actividad enzimática de las enzimas. Según se informó anteriormente (Collins, Gerday et al. 2005, Cai, Shi et al. 2011), la mayoría de las xilanasas tienen una actividad óptima a pH entre 5,0 y 7,0, y generalmente pierden actividad a valores de pH lejos de este rango. La estabilidad de la xilanasas a altas temperaturas es ventajosa para aplicaciones industriales, ya que la reacción enzimática podría llevarse a cabo a temperaturas elevadas, reduciendo el riesgo de contaminación microbiana (Gawande and Kamat 1998).

Así, probamos la termoestabilidad de la enzima inmovilizada a pH 7,0 y 60° C. La Bioxilanasas soluble retuvo 14% de actividad después de 24 h de incubación. La unión unipuntual en soporte BrCN fue más estable que la enzima

soluble, con una media vida de 24 h, mientras que Ag-G BIO conservó 56% de actividad después de 24 h en las mismas condiciones (Figura 27). La enzima inmovilizada, Ag-G BIO, alcanzó su vida media después de 48 h de incubación.

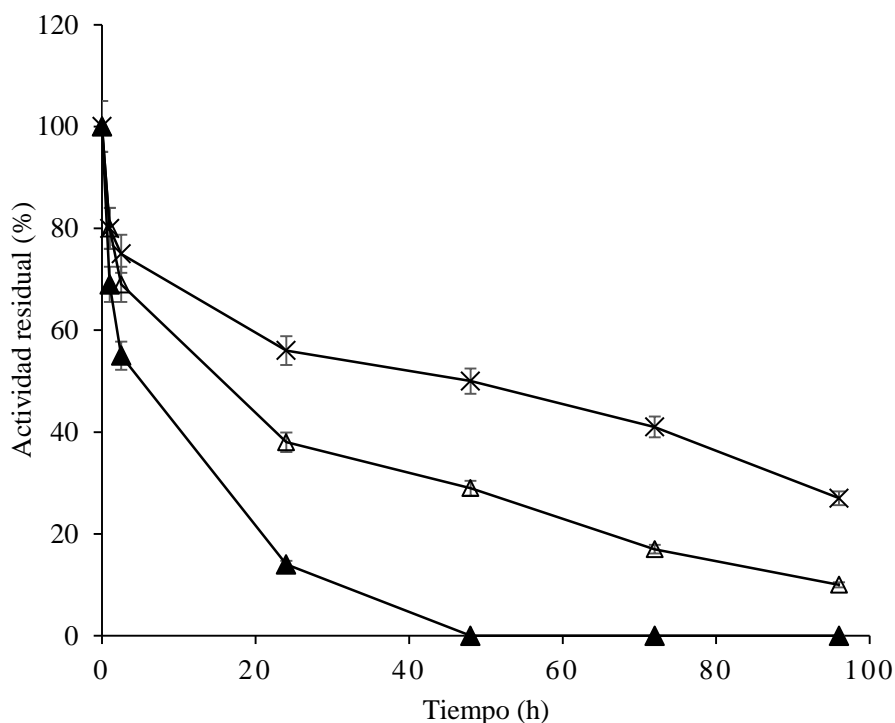


Figura 27 – Estabilidad Bioxilanasas - pH 7 60 ° C: Efecto del pH en el perfil del derivado BIO y la enzima soluble. Los experimentos se realizaron a 60°C pH 7, usando xilano como sustrato. El derivado se diluyó en una solución de tampón 25 mM de Fosfato de sodio. Enzima soluble (▲); BrCN (△) y Ag-G BIO (×).

BIO consiste en una mezcla de xilanasas y algunas actividades secundarias. Los grupos α -L-arabinofuranosilo del xilano se forman por enlaces alfa-1,3 con la columna vertebral de xilano (Soerensen, Pedersen et al. 2011). Aunque la cantidad de L-arabinosa en las cadenas de xilano es bastante baja (Rantanen, Virkki et al. 2007), su presencia en las cadenas laterales restringe la actividad de las xilanasas, lo que contribuye a una mejor estabilidad de BIO inmovilizada, cuando en comparación con otras enzimas, *p.e.* D333MDP.

5.3.4 Aminación química de la superficie de la enzima bioxilanasas inmovilizada en soporte glioxil-agarosa.

La bioxilanasas inmovilizada no se vio afectada aparentemente por este tratamiento, ya que el 100% de la actividad se mantuvo después de la aminación química. Ag-G BIO aminado (BIO AMN) fue 2 veces más estable que Ag-G BIO. Después de 24 horas de incubación a 60° C pH 7, la BIO AMN retuvo el 80% de actividad y, en las mismas condiciones, Ag-G BIO conservó el 56% de actividad. El biocatalizador BIO AMN retuvo el 49% de la actividad después de 96 h de incubación. (Figura 28).

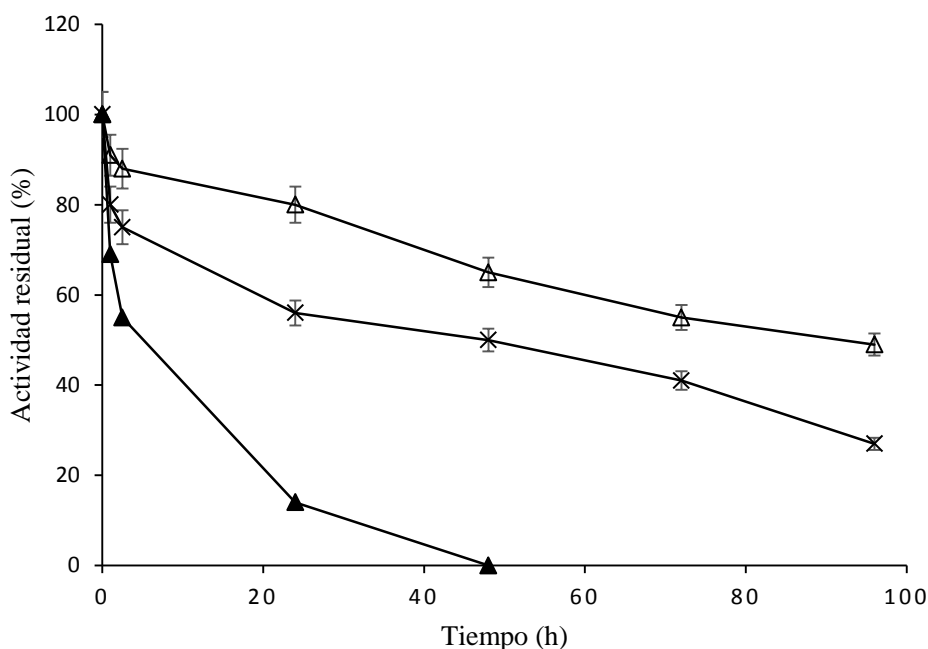


Figura 28 - Efecto de la aminación química sobre la estabilidad de la Bioxilanasas inmovilizada. El derivado se suspendió en tampón de fosfato sódico 0,025 M a pH 7,0 y 60° C. Símbolos: Bioxilanasas soluble (○), Ag-G BIO (×) and BIO AMN (▲).

Se ha demostrado que la aminación química del derivado Ag-G BIO con etilendiamina mejora las propiedades enzimáticas, cambia los grupos cargados negativamente a grupos cargados positivamente a pH neutro, sin afectar al centro activo de la enzima y manteniendo el 100% de su actividad. Esto se justifica por el hecho de que la aminación química de los grupos carboxílicos sobre la superficie de la enzima promueve cambios en las propiedades físicas de la superficie de xilanasas, generando nuevas fuerzas de repulsión y la producción de nuevas interacciones, incrementando la estabilidad de la enzima (López-Gallego, Montes et al. 2005, Rodrigues, Berenguer-Murcia et al. 2011).

5.3.5 Efecto de la modificación físico-química de la enzima inmovilizada con polímeros viscosos.

La mayoría de las enzimas no tienen todas las características necesarias para su implantación industrial (estabilidad, selectividad, actividad hacia sustratos no naturales, etc.). Por estas razones, la mejora de las propiedades de las enzimas mediante técnicas de post-inmovilización, se convierte en un excelente instrumento tecnológico (Mateo, Palomo et al. 2007). En cierto modo, las inmovilizaciones que no mejoran significativamente las propiedades de las enzimas (p.e. enzimas poco activas y poco estables) no tienen gran relevancia industrial. Por eso, las modificaciones físico-química son una estrategia muy útil para mejorar la estabilidad de los biocatalizadores enzimáticos.

Con el objetivo de intentar aumentar la estabilidad de los derivados sintetizados, se utilizaron técnicas de modificaciones post-inmovilización utilizando polímeros viscosos con la finalidad de formar una capa protectora da enzima inmovilizada frente a los agentes desnaturizantes del medio de reacción.

Los polímeros mostraron ser muy eficientes y los resultados serán presentados en los apartados siguientes.

5.3.5.1 Efecto de la adición de una capa de Polietilenimina.

El Ag-G BIO mostró una mejora considerable en la estabilidad después de la estratificación con PEI. Con respecto a la estabilidad térmica, el biocatalizador BIO AMN retuvo el 49% de la actividad después de la incubación durante 96 h a pH 7 y 60° C (Figura 29).

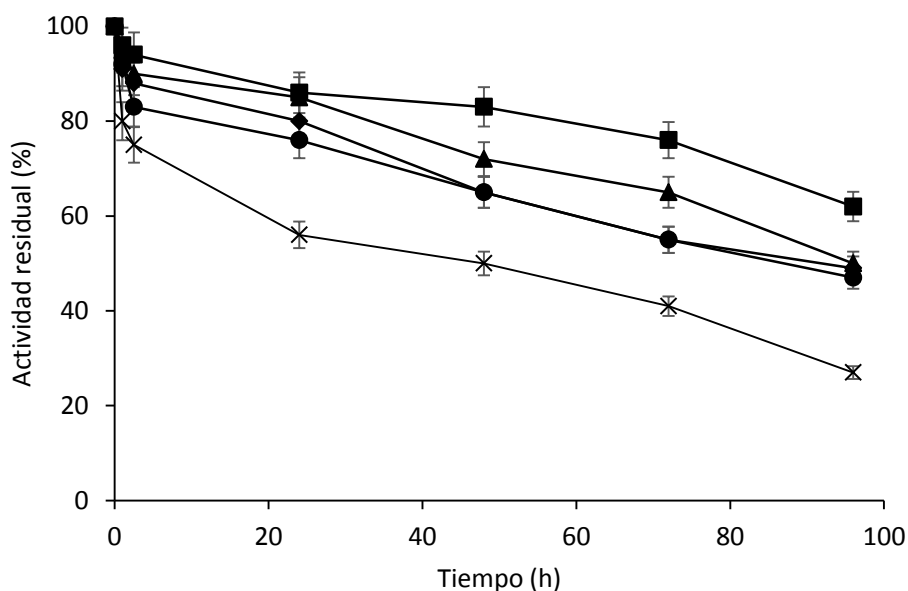


Figura 29 - Efecto de la capa de polietilenimina sobre la estabilidad de los derivados Ag-G BIO en tampón de fosfato sódico 0,025 M pH 7,0 y 60° C. Los derivados fueron modificados con capas de PEI con un PM de 1.300, 10.000 y 25.000. Símbolos: Ag-G BIO (×), BIO AMN (◆); BIO 1.3 (▲); BIO 10 (■) y BIO 25 (●).

En las mismas condiciones, Ag-G BIO con PEI 1.300 (BIO 1.3), Ag-G BIO con PEI 10.000 (BIO 10) y Ag-G BIO con PEI 25.000 (BIO 25) conservaron 50, 62 y 47% de actividad alas 96h, respectivamente. Con 96 h de incubación a pH 7,0 y 60 ° C, BIO 10 fue 4 veces más

estable que el biocatalizador aminado, reteniendo 62% de actividad recuperada.

Podemos justificar esta mejora por el hecho de que PEI es un polímero hidrófilo y actúa como barrera formando una capa muy densa que protege al biocatalizador, haciéndolo resistente a altas temperaturas, impidiendo que la enzima se mueva y aumentando su vida útil.

5.3.5.2 Efecto de la adición de una capa de dextrano.

El dextrano-aldehído se ha utilizado como un armazón muy adecuado para fijar capas densas de PEG sobre la superficie de la enzima mientras se evita la exposición de los grupos hidrófobos desde el interior de la enzima (Moreno-Pérez, Orrego et al. 2016). Para la construcción de estas capas de modificación enzimática, utilizamos polímeros de aldehído-dextrano (ver 4.5.2.2). Estos polímeros que contienen aldehído se pueden unir fácilmente a una superficie altamente aminada de la enzima, de modo que toda la superficie de la enzima está completamente cubierta por dichos cationes (Betancor, Fuentes et al. 2005), en este caso, AMN o PEI. La inactivación térmica del derivado AMN / PEI con la capa de dextrano en comparación con la no modificada se probó a 60° C pH 7 (Figura 30a y 30b).

a)

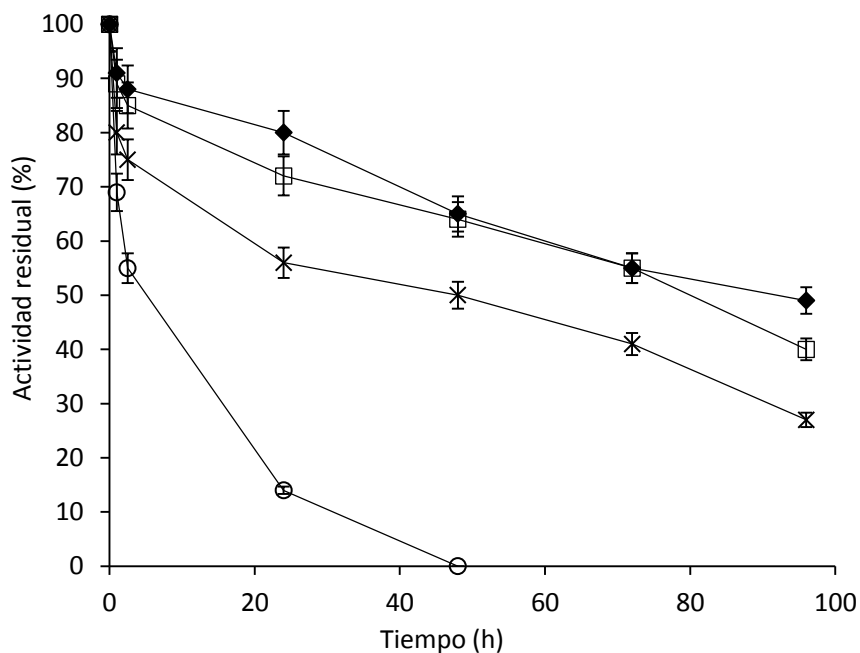


Figura 30a - Efecto de la capa de dextrano 40000Da en la estabilidad del BIO AMN derivado. El derivado con la capa de dextrano 1:10 (p / v) fue suspendido en tampón de fosfato de sodio 0,025 M pH 7,0 y se incubaron a 60° C. Símbolos: BIO soluble (○); Ag-G BIO (×); BIO AMN (◆) y BIO AMN-Dx 40000Da (□).

b)

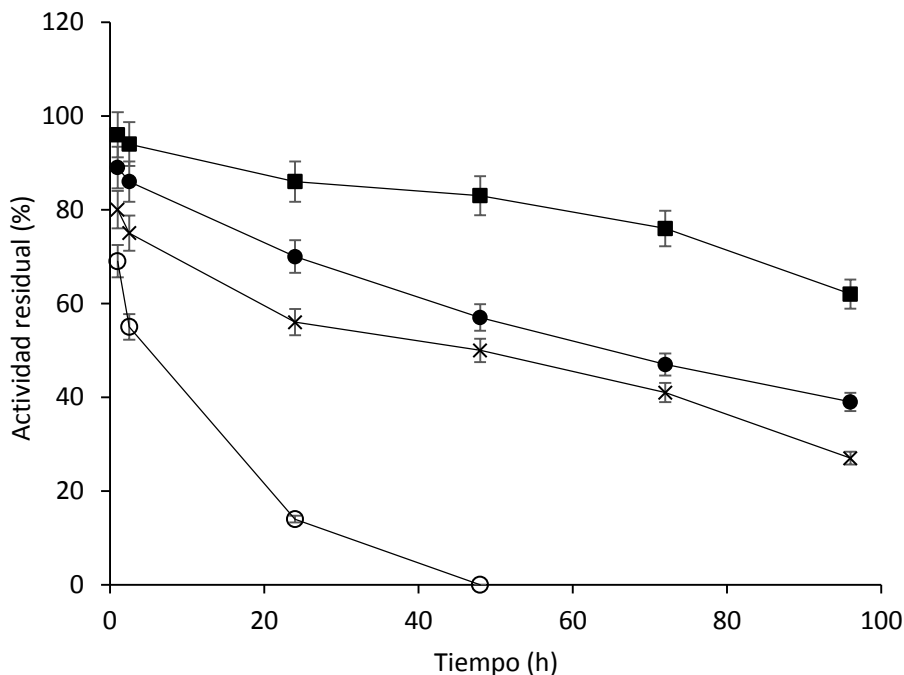


Figura 30b - Efecto de la capa de dextrano 6000Da en la estabilidad del BIO 10 derivado. El derivado con la capa de dextrano 1:10 (p / v) fue suspendido en tampón de fosfato de sodio 0,025 M pH 7,0 y se incubaron a 60° C. Símbolos: BIO soluble (○); Ag-G BIO (×); BIO 10 (■) y BIO 10-Dx 6000Da (●).

La capa del dextrano no dio lugar a buenos resultados cuando fue aplicada sobre los derivados aminados (BIO AMN o BIO 10). Entre todos los pesos moleculares probados (Dx PM 1.500, 6.000, 25.000 y 40.000 Da) (resultado no mostrados) sobre los derivados BIO AMN y BIO 10, la estabilidad térmica en general, fue mejor en los derivados que no presentaban la capa de dextrano.

BIO AMN-Dx 40000, mantuvo una actividad del 64% después de 48 horas de incubación a 60°C pH 7, mientras que, en el mismo período, la BIO AMN retuvo un 65% de actividad. En las mismas condiciones, después de 90 h, BIO 10 y BIO 10-Dx 6000 retuvieron el 62% y el 39% de actividad, respectivamente.

5.3.5.3 *Efecto de la adición de una capa de metoxipolietilenglicol.*

La PEGilación masiva de la superficie de la enzima debe generar una capa altamente viscosa que consiste en los segmentos de PEG que rodean la superficie de la enzima. Esta capa viscosa debe prevenir o reducir las distorsiones de la superficie de la enzima en presencia de agentes desnaturalizantes (Fernandez-Lorente, Lopez-Gallego et al. 2015). Sin embargo, la química utilizada para el apego tiene que ser benigna y no interferir con el funcionamiento del biocatalizador.

Después del recubrimiento con dextrano, permanecen en el derivado varios residuos de grupos aldehído pertenecientes del dextrano, que reaccionan con un exceso de PEG-NH₂ (Moreno-Pérez, Orrego et al. 2016) generando una tercera capa para BIO 10 y una segunda capa para BIO AMN, proporcionando así una protección con diferentes capas de polímeros alrededor de la enzima.

Con la finalidad de elegir este “andén” (Dx) a ser utilizado como conexión en la unión del PEG con el derivado aminado o con una capa de PEI (BIO AMN o BIO 10), produciendo una multicapa, se realizó una comparación sólo entre los derivados con la capa de dextrano y entre ellos, el Dx 40000 y 6000 Da, fueron los mejores cuando se añadieron a los derivados BIO AMN y BIO 10, respectivamente.

A diferencia del derivado con la capa de dextrano, del derivado con la capa de PEG 2000Da y ahora llamada multicapa o MC (AMN / PEI + dextrano + PEG), mostró una considerable mejoría en su estabilidad (Figura 31 y 32).

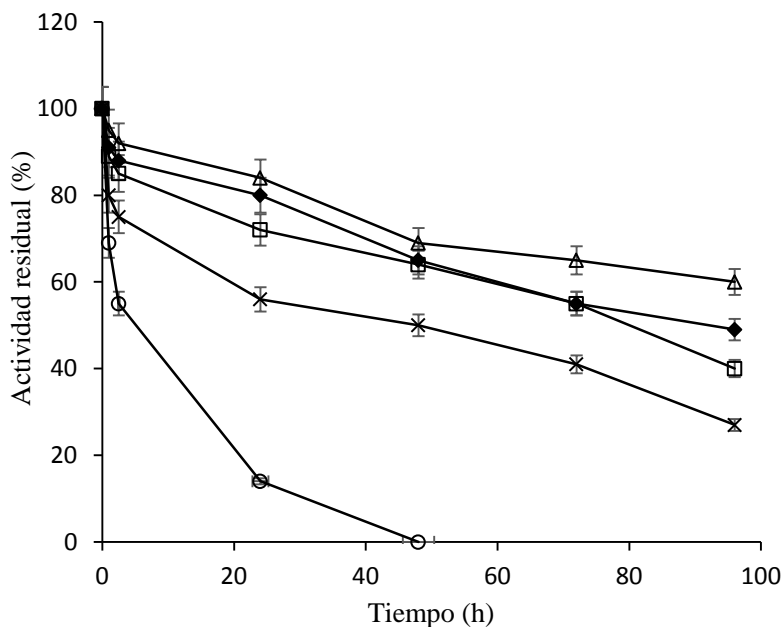


Figura 31 - Efecto de la capa de metoxipolietilenglicol amino (PEG) sobre la estabilidad del derivado BIO AMN-Dx40000 incubado en tampón fosfato sódico 0,025 M pH 7,0 y 60° C. Símbolos: Bioxilanasa soluble (○); Ag-G BIO (×); BIO AMN (◆); BIO AMN-Dx 40000Da (□); BIO AMN MC (Δ).

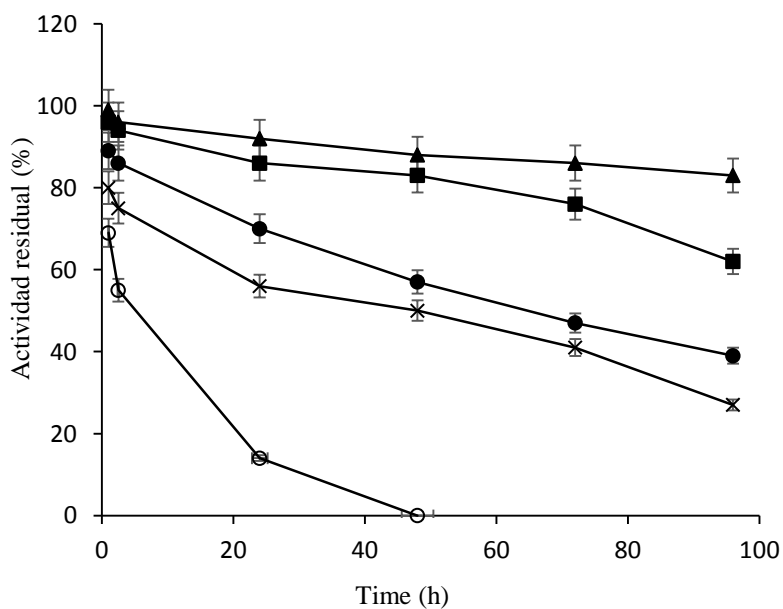


Figura 32 - Efecto de la capa de metoxipolietilenglicol amino (PEG) sobre la estabilidad del derivado BIO 10-Dx 6000 incubado en tampón fosfato sódico 0,025 M pH 7,0 y 60° C.

°C. Símbolos: Bioxilanasa soluble (○); Ag-G BIO; BIO 10 (■); BIO 10-Dx 6000Da (●) and BIO 10 MC (▲).

La inactivación térmica de los derivados PEGilados en comparación con los no modificados se ensayó a 60° C pH 7. El derivado BIO AMN MC conservó el 60% después de 96 h de incubación, mientras que, en las mismas condiciones, los biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN y BIO AMN-Dx 40000Da retuvieron 27, 49 y 40%, respectivamente, de actividad residual. BIO 10 MC después de 24 h de incubación, a 60° C pH 7, mantuvo un 92% de actividad residual.

Igualmente, en un largo período de incubación a 60° C pH 7, los derivados con la MC presentaron una estabilidad térmica muy superior a los otros biocatalizadores. Después de 96 horas de incubación, BIO 10 MC conservó un 83% de actividad. En las mismas condiciones, BIO 10 y BIO 10-Dx 6000 conservaron 62 y 39%, respectivamente.

Cuando fueron comparados los dos mejores biocatalizadores inmovilizados y modificados, BIO AMN MC y BIO 10 MC, bajo las mismas condiciones (60 ° C pH 7), BIO 10 MC demostró mayor estabilidad, reteniendo más del 80% de actividad después de 96 h de incubación, mientras que BIO AMN MC retuvo el 60% (figura 33).

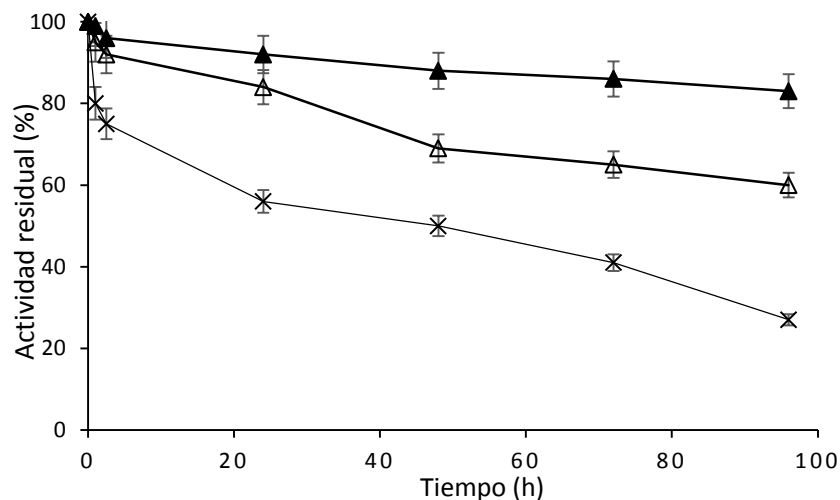


Figura 33 - Efecto de la multicapa sobre la estabilidad del derivado BIO AMN en comparación con el derivado BIO 10. Los derivados fueron 1:10 (p / v) suspendidos en tampón de fosfato de sodio 0,025 M pH 7,0 y se incubaron a 60 °C. Símbolos: Ag-G BIO (×), BIO AMN MC (Δ) y BIO 10 MC (▲).

Los derivados con MC fueron considerablemente más estables que los derivados sin modificaciones físico-químicas. Esto puede ser debido a que las capas de los polímeros viscosos se formaron una barrera de protección frente a los agentes desnaturizantes, logrando un aumento en la estabilidad incluso bajo largos períodos de incubación a alta temperatura.

5.3.6 Hidrolisis enzimática del xilano.

La formación de un enlace covalente muy estable entre la enzima y el soporte, permite el uso de los derivados (sin posibilidad de desorción de la enzima) en cualquier tipo de medio de reacción. Así, fue realizado reacciones de hidrolisis enzimática, utilizando xilano de haya y de maíz, para comprobar la eficiencia de los biocatalizadores inmovilizados y modificados ya optimizados frente a los biocatalizadores solo inmovilizados.

5.3.6.1 Hidrolisis de xilano de haya.

Los biocatalizadores se evaluaron en cuanto a su capacidad para liberar azúcares reductores a partir de reacciones de hidrólisis de xilano de madera de haya. La liberación de azúcares reductores se estudió en condiciones de escala industriales (Katchalski-Katzir and Kraemer 2000, Seijás 2012) (50° C), ya que es en este rango que las industrias operan, con los mejores biocatalizadores inmovilizados y modificados, BIO 10 MC y BIO AMN MC, y con un biocatalizador inmovilizado sin modificación, Ag-G BIO como control.

La Figura 34 muestra los resultados de la cinética de hidrólisis de xilano de madera de haya. El biocatalizador Ag-G BIO logró el 76% de la liberación de azúcares reductores en sólo 5 h de reacción, alcanzando una hidrólisis del 100% después de 15 horas. BIO AMN MC y BIO 10 MC hidrolizaron el sustrato más eficientemente que el biocatalizador Ag-G BIO, obteniéndose una hidrólisis del 100% después de 4 y 3h, respectivamente.

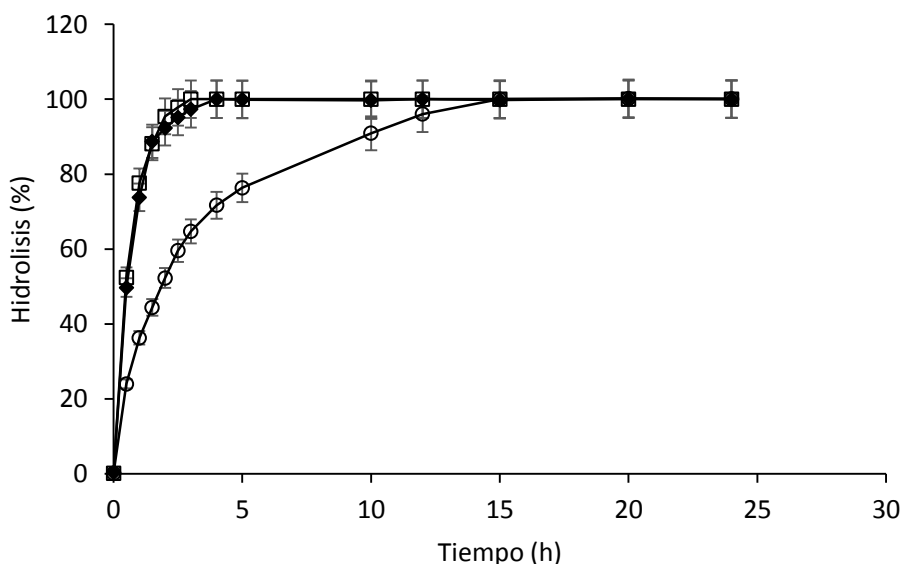


Figura 34 - Cinética de hidrólisis de xilano llevada a cabo por los biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC. La hidrólisis de xilano de madera de haya solubilizada

al 4% (p / v) se realizó a pH 5,0 y a 50° C, 150 rpm, usando 0,1 g de cada biocatalizador. Símbolos: Ag-G BIO (○); BIO AMN MC (◆) y BIO 10 MC (□).

Los resultados de tiempo de reacción de hidrólisis mostraron mejor rendimiento para los derivados inmovilizados y modificados con polímeros. Ambas preparaciones fueron más eficientes en la conversión del xilano de haya, demostrando el gran potencial del método de modificación con polímeros viscosos en la aplicación en biocatalizadores para reacciones enzimáticas.

5.3.6.2 Hidrolisis de xilano de maíz.

La hidrolisis de xilano de maíz fue realizada con los mismos biocatalizadores utilizados en la hidrolisis de xilano de haya (Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC). El biocatalizador Ag-G BIO logró el 90% de la liberación de azúcares reductores después de 24 h de reacción, alcanzando una hidrólisis del 100% después de 32 horas de reacción a 50° C. BIO AMN MC y BIO 10 MC hidrolizaron el sustrato más eficientemente que el biocatalizador Ag-G BIO. Los dos biocatalizadores inmovilizados y modificados obtuvieron el 100% de hidrólisis en 28 h de reacción (figura 35).

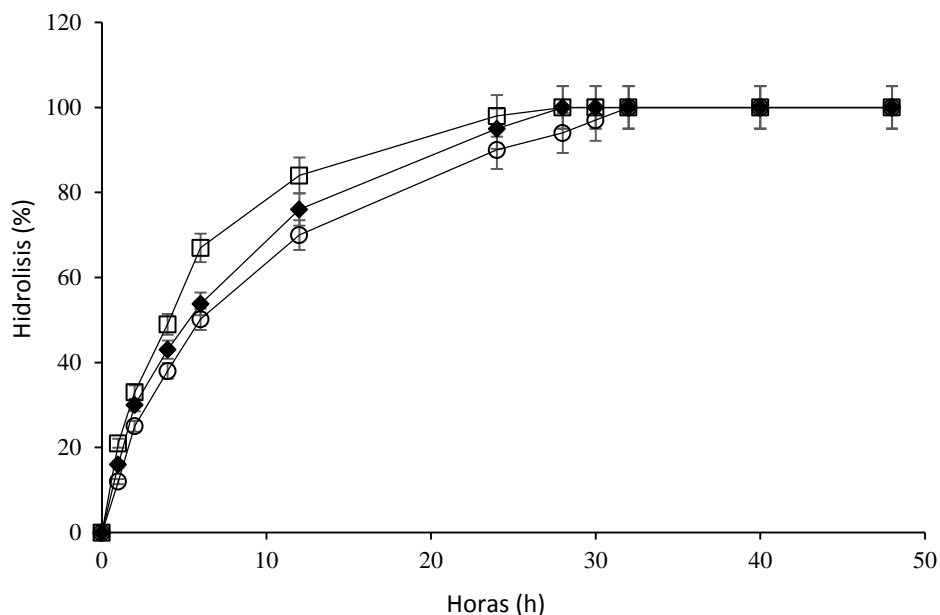


Figura 35 - Cinética de hidrólisis de xilano maíz por biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC. La hidrólisis de xilano de maíz solubilizado al 4% (p / v) se realizó a pH 5,0 y a 50 °C, 150 rpm, usando 0,1 g de cada biocatalizador. Símbolos: Ag-G BIO (○); BIO AMN MC (◆) y BIO 10 MC (□).

5.3.7 Análisis de los XOS producidos en la reacción de hidrólisis de xilano de haya.

De acuerdo con el análisis de XOS por HPLC, la composición del producto después de 15 h de hidrólisis de xilano consistió principalmente en xilobiosa (91%) con el biocatalizador Ag-G BIO. BIO AMN MC requiere 4 h para producir 87% xilobiosa, mientras que el biocatalizador BIO 10 MC sólo requiere 3 h para lograr una xilobiosa al 85% (tabla 4).

Tabla 4 - Composición de la mezcla de XOS obtenida de hidrólisis de xilano de madera de haya utilizando biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC.

Biocatalizadores	Tiempo de reacción (h)	Xilooligosacáridos (%)		
		Xilosa	Xilobiosa	Xilotriosa
Ag-G BIO	15	5	91	4
BIO AMN MC	4	7	87	6
BIO 10 MC	3	7	85	8

Cuando hacemos la comparación entre los biocatalizadores probados en la reacción, notamos que se obtuvieron resultados muy parecidos entre ellos. Ag-G BIO fue el biocatalizador que logro el mayor porcentaje de producción de xilobiosa en 15 horas de reacción. Mientras BIO 10 MC solamente ha necesitado 3 horas de reacción para producir un 85% de xilobiosa, 4 veces más rápido que el biocatalizador sin modificaciones. Esto puede demostrar el potencial de la MC en el soporte inmovilizado, favoreciendo su aplicación en escala industrial.

5.3.8 Análisis de los XOS producidos en la reacción de hidrolisis de xilano de Maíz.

Según el análisis de XOS por HPLC, la composición del producto después de 32 h de hidrólisis de xilano consistió principalmente en xilobiosa (79%), xilosa (11%) y xilotriosa (10%) con biocatalizador Ag-G BIO. Los biocatalizadores modificados, BIO AMN MC y BIO 10 MC, requieren 28 h para producir, respectivamente, 78 y 80% de xilobiosa, 10 y 14% de xilosa, y 12 y 6% de xilotriosa (tabla 5).

Tabla 5- Composición de la mezcla de XOS obtenida de hidrólisis de xilano de maíz utilizando biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC.

Biocatalizadores	Tiempo de reacción (h)	Xilooligosacáridos (%)		
		Xilosa	Xilobiosa	Xilotriosa
Ag-G BIO	32	11	79	10
BIO AMN MC	28	10	78	12
BIO 10 MC	28	14	80	6

La hidrolisis del xilano de maíz fue realizada utilizando los mismos biocatalizadores utilizados en la hidrolisis del xilano de haya (Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC). El tiempo de reacción fue muy superior en la hidrolisis con xilano de maíz, produciendo una cantidad de xilobiosa inferior al xilano de haya. Lo que se puede concluir que el xilano de maíz no se encuadra con los objetivos, donde se busca producir biocatalizadores óptimos de los derivados inmovilizados y modificados de la enzima BIO, para hidrolizar diferentes xilanos logrando producir una gran cantidad de XOS capaces de ser considerados prebióticos, en un menor tiempo de reacción.

5.3.9 Reutilización de los biocatalizadores.

Por razones técnicas y económicas, la mayoría de los procesos catalizados por enzimas se mejoran notablemente si podemos reusar la enzima en numerosos ciclos de reacción (Seijás 2012). El desarrollo de métodos de inmovilización y post-inmovilización sencillos y de bajo coste son muy importantes. Desde este punto de vista los biocatalizadores fueran probados durante diferentes ciclos de reacción obteniendo resultados muy interesantes que son demostrados en los apartados siguientes.

5.3.9.1 Ciclo de reacciones con xilano de haya.

Para probar la aplicabilidad de estos biocatalizadores inmovilizados en la industria, se ensayaron los modificados (BIO AMN MC y BIO PEI MC) y no modificados (Ag-G BIO) durante varios ciclos de reacción de hidrólisis de xilano a 50°C y pH 5,0 (Figura 36).

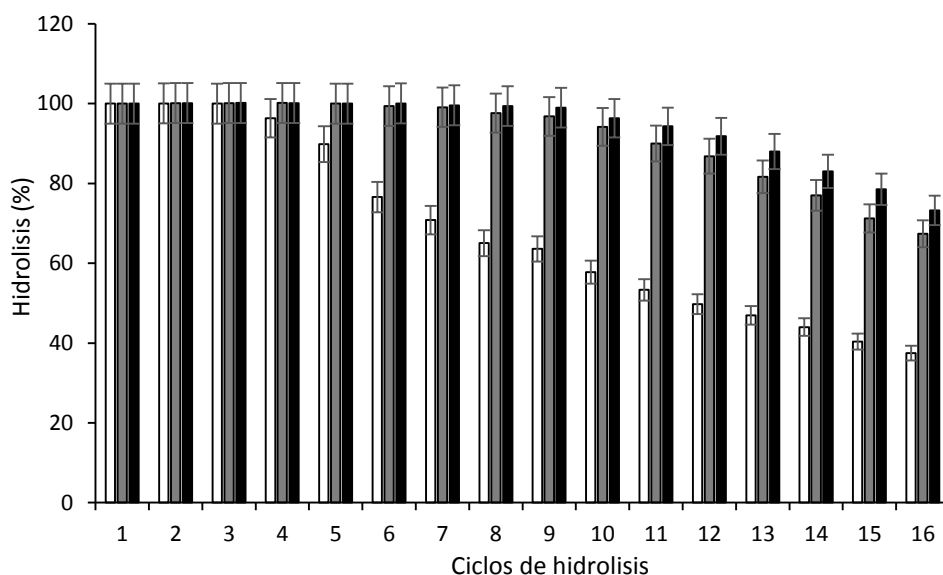


Figura 36 - Estabilidad de biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC durante ciclos operativos de hidrólisis de xilano. Cada ciclo se realizó con xilano de madera de haya solubilizado al 4% (p / v) a pH 5,0 y a 50° C, 150 rpm, utilizando 0,1 g (0,9 mg prot / g de soporte) de cada biocatalizador. Símbolos: Ag-G BIO (□); BIO AMN MC (▒) y BIO 10 MC (■). La actividad antes del primer ciclo fue considerada como 100%.

Respecto a la reacción en el tiempo de cada biocatalizador, previamente determinada (Figura 34) y durante 15 ciclos de reacción (pasos secuenciales de hidrólisis-lavado-hidrólisis) (Figura 36), el BIO PEI MC fue confirmado como el mejor biocatalizador por su capacidad de reutilización y tiempo de reacción inferior al necesario por los derivados BIO AMN MC y Ag-G Bio, para completar la misma reacción.

Bio 10 MC logró más del 90% de la liberación máxima de azúcares reductores durante once ciclos, mientras que BIO AMN MC empezó a bajar el rendimiento del 90% después del ciclo nueve. Por el contrario, después de tres ciclos, el biocatalizador Ag-G BIO muestra un menor grado de liberación de azúcares reductores, alcanzando el 65% del rendimiento máximo al final del octavo ciclo.

La alta estabilidad de los biocatalizadores inmovilizados y modificados con polímeros puede ser el motivo por lo que se logró una excelente capacidad de reuso de los biocatalizadores BIO AMN MC y BIO PEI MC.

5.3.9.2 *Ciclo de reacciones con xilano de maíz.*

Los biocatalizadores fueron probados durante 6 ciclos de reacción (pasos secuenciales de hidrólisis-lavado-hidrólisis) (figura 37) de acuerdo con el tiempo previamente determinada por los biocatalizadores para completar la reacción de hidrólisis con el xilano de maíz (figura 35).

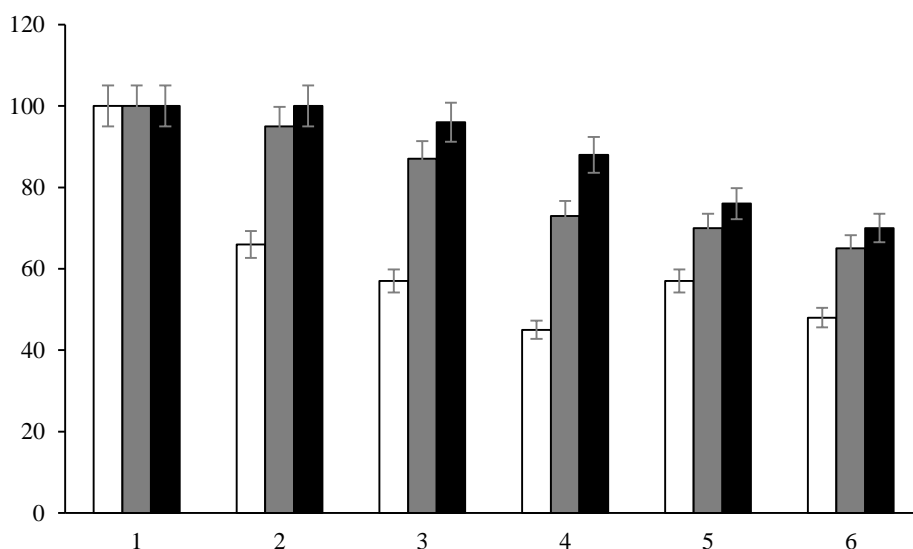


Figura 37 - Estabilidad de biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC durante ciclos operativos de hidrólisis de xilano de maíz. Cada ciclo se realizó con

xilano de maíz solubilizado al 4% (p / v) a pH 5,0 ya 50 °C, 150 rpm, utilizando 0,1 g (0,9 mg prot / g de soporte) de cada biocatalizador. Símbolos: Ag-G BIO (□); BIO AMN MC () y BIO 10 MC (■). La actividad antes del primer ciclo fue considerada como 100%.

El BIO 10 MC fue confirmado una vez más como el mejor biocatalizador por su capacidad de reutilización. BIO AMN MC logró más del 90% de la liberación máxima de azúcares reductores en dos ciclos, mientras que BIO 10 MC demostraba la máxima conversión de xilano hasta el segundo ciclo. El biocatalizador BIO 10 MC logró ser capaz de realizar 4 ciclos con más de 90% de eficiencia en la liberación de azúcares reductores. Por el contrario, después del primer ciclo, el biocatalizador Ag-G BIO muestra un menor grado de liberación de azúcares reductores, alcanzando el 66% del rendimiento máximo al final del ciclo dos.

Cuando fue probada la capacidad de reuso de los derivados para hidrolizar diferentes soluciones de xilano de maíz, se observa que los biocatalizadores no tuvieron la misma eficacia en lograr la liberación de AR de la primera reacción y empezaron a perder su actividad rápidamente después de cada ciclo. Eso se puede explicar por la enorme cantidad de AR presente en este xilano, haciendo que los biocatalizadores necesiten una mayor carga de actividad enzimática para hidrolizar el xilano de maíz, necesitando más tiempo de reacción, y esto implique que queden expuestos más tiempo al medio de reacción afectando negativamente a la enzima.

5.3.10 Conclusión.

La enzima bioxilanasas, de *T. reesei*, se inmovilizó con éxito por unión covalente multipuntual sobre agarosa del 10% reticulada altamente y activada con grupos aldehído. El proceso de inmovilización presentó un rendimiento superior al 87% y el biocatalizador inmovilizado presentó un 80% de actividad xilanasas. Además, los derivados mostraron buenos resultados en la estabilidad

térmica a pH 7,0 y 60° C. La Bioxilanasas inmovilizada fue 19 veces más estable que la enzima soluble.

Los resultados mostraron una mejora significativa en la estabilidad del derivado bioxilanasas cuando se completó la modificación físico-química del derivado con múltiples capas de polímeros. BIO AMN MC fue 48 veces mejor que la enzima soluble, mientras que BIO 10 MC mejoró la estabilidad de la enzima 48 veces en relación con Ag-G BIO y 384 veces en relación con la enzima soluble. Al comparar los dos derivados inmovilizados y modificados, se observó que BIO 10 MC fue 4 veces más estable que BIO AMN MC, lo que confirma que el derivado con una densa multicapa de polímeros viscosos, producida con PEI 10000, dextrano 6000 y PEG 2000, sobre la superficie de la enzima inmovilizada fue más eficaz en la protección contra los agentes desnaturizantes del medio sobre la enzima Bioxilanasas. Este derivado cubierto de capas mantuvo un 83% de actividad incluso después de 96 h de incubación a pH 7,0 y 60 °C.

La hidrólisis enzimática del xilano depende del número y posición de los puntos de ramificación en su la cadena principal. Según Vardakou et al. (2004) (Vardakou, Katapodis et al. 2004), las xilanasas de familia GH11 tienen sitios activos grandes y prefieren las cadenas principales de escisión en regiones no sustituidas, mientras que las xilanasas de familia GH10 tienen sitios activos más pequeños y son capaces de escindir las cadenas principales más cerca del sustituyente. BIO es un coctel enzimático la cual tiene en su mezcla enzimas de las dos familias en sinergia. Los biocatalizadores producidos a partir de este coctel presentaron resultados relevantes de acuerdo con el objetivo de este trabajo.

La hidrólisis de xilano de haya y maíz demostró la eficiencia del proceso para el biocatalizador. Con el xilano de haya, el derivado Ag-G BIO logró cuatro ciclos que retenían más del 90% de actividad y produciendo alrededor del 91% de xilobiosa en 15 h de reacción, tres veces más del tiempo requerido por BIO AMN MC para producir 87% de xilobiosa. El derivado BIO 10 MC consiguió

once ciclos reteniendo más del 90% de actividad y produciendo alrededor del 85% de xilobiosa en 3 h de reacción. Con el xilano de maíz, el tiempo que los biocatalizadores necesitaron para completar la reacción fue muy superior al tiempo requerido para el xilano de haya. Ag-G BIO tardó 32 h para completar la reacción produciendo un 79% de xilosa y fue posible su reuso en apenas un ciclo con conversión superior al 90% de liberación de azúcares reductores. Mientras los biocatalizadores modificados, requerirán 28 h para lograr la reacción, produciendo un 78 y 80% de xilobiosa con BIO AMN MC y BIO 10 MC respectivamente. BIO AMN logró ser capaz de reutilizar en dos ciclos de reacción con eficacia superior al 90% de conversión, mientras BIO 10 MC mantuvo durante tres ciclos la misma eficacia.

Este grado de conversión de xilano en xilobiosa es muy interesante en términos de aplicabilidad a escala industrial. La modificación físico-química del derivado con multicapas con polímeros reforzó la resistencia del biocatalizador durante varios ciclos operativos, mejorando consecuentemente su aplicabilidad.

5.4 Estudio de la inmovilización-estabilización de la bioxilanasas en soporte celulosa.

La celulosa fue utilizada como alternativa de soporte a la agarosa ya que es mucho más económico y además posee la ventaja de que se podría trabajar en un reactor en continuo, aunque no haya dado tiempo a probar dicho punto.

Con el objetivo de producir un biocatalizador de bajo costo, fue elegido utilizar las condiciones experimentales óptimas lograda con en BIO 10 MC (mostradas en el apartado 5.3) en el soporte celulosa. Los resultados obtenidos serán presentados a continuación.

5.4.1 Estudio de la Inmovilización-estabilización de la Bioxilanasas.

5.4.1.1 Inmovilización de la endoxilanasa comercial BIO por unión covalente multipuntual a glioxil-celulosa.

La enzima se inmoviliza a pH 10 para fomentar que varios residuos Lys se puedan unir simultáneamente al soporte ya que una única unión amino glioxil es reversible y no es capaz de inmovilizar la enzima. Después de la inmovilización la enzima se deja que siga interaccionando con el soporte para formar más enlaces Lys-glioxil. A consecuencia de esta intensa inmovilización covalente multipuntual, el derivado inmovilizado fue mucho más estable que la enzima soluble.

BIO fue inmovilizada en condiciones alcalinas sobre celulosa altamente activada con grupos glioxil (Cel) donde ofrecemos 90 mg proteína/g soporte (100U/g soporte). El protocolo de inmovilización fue descrito anteriormente en el apartado 4.4.1.2. La enzima BIO se disolvió en tampón bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10 y esta solución se añadió al soporte e incubó a 25°C. De esta manera, después de 1 h de incubación, BIO mostró un 40% de rendimiento de inmovilización, alcanzando el 79% después de 24 horas y un 60% de actividad recuperada. Con la finalidad de obtener unos mejores resultados, se trató de optimizar el protocolo de inmovilización aumentando el tiempo de incubación en condiciones alcalinas, de la misma forma como fue realizada con agarosa. Así, la enzima se incubó bajo las mismas condiciones anteriores siguiendo el proceso durante 72 horas. Después de 48 h de incubación, BIO mostró un 85% de inmovilización y un 85% de actividad recuperada. El rendimiento de inmovilización permaneció constante entre las 48 y 72 horas, pero la actividad recuperada disminuía llegando a un 45% a las 72 horas de incubación (tabla 6). En este caso, de la misma forma que ocurrió con la incubación de la enzima D333MDP, tiempos de incubación más prolongados en condiciones alcalinas afectaron negativamente a la actividad expresada ocasionando su pérdida de actividad. Así, se optó por definir como 48 h el tiempo de inmovilización ideal

para los próximos experimentos, dando como resultado un derivado (Cel BIO) con 77 mg de proteína/g soporte.

Tabla 6 – Rendimiento de Inmovilización y actividad recuperada del derivado Cel BIO (BIO inmovilizada en soporte glioxil celulosa).

Tiempo	% Inmov.	% Act. Rec.
	0	0
1 h	40	21
2 h	46	27
3 h	53	46
4 h	56	53
24 h	79	60
48 h	85	85
72 h	84	45

5.4.1.2 Estabilización de los biocatalizadores de la xilanasa BIO inmovilizada en soporte glioxil-celulosa y modificada con polímeros viscosos.

La estabilidad térmica del derivado fue realizada sobre las mismas condiciones hechas con el derivado Ag-G BIO. El Cel BIO y la enzima soluble se incubaron en tampón fosfato de sodio 25mM a pH 7,0 y 60° C. La Bioxilanasa soluble retuvo 14% de actividad después de 24 h de incubación, mientras que Cel BIO conservó 55% de su actividad en las mismas condiciones (Figura 38). La enzima inmovilizada, Cel BIO, presentó una vida media de 36 h bajo dichas condiciones de incubación.

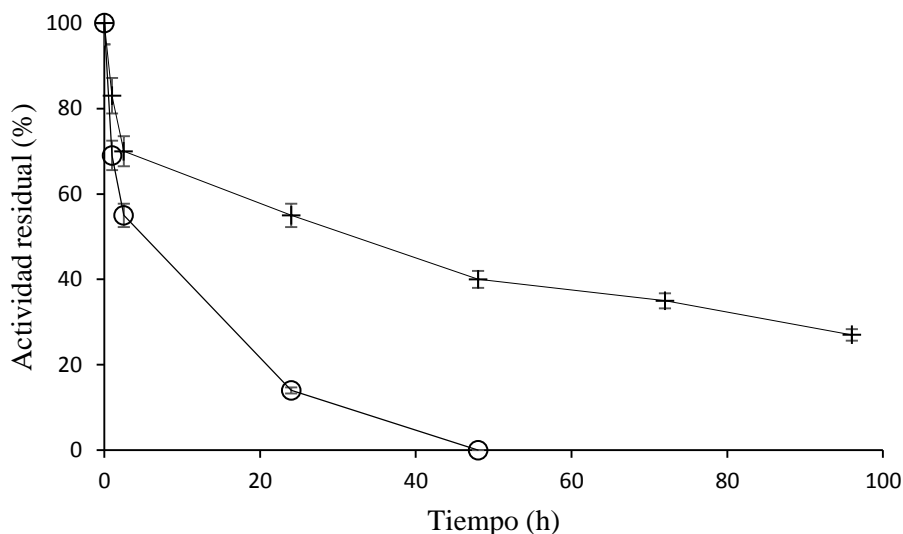


Figura 38 - Estabilidad de Cel BIO y BIO soluble en tampón fosfato 25mM, pH 7 y 60° C. Enzima soluble (○) y Cel BIO (+).

5.4.2 Efecto de la multicapa de polímeros viscosos (MC) en el derivado obtenido a partir de la enzima BIO inmovilizada en soporte celulosa.

Para mejorar su estabilidad térmica los derivados inmovilizados se recubrieron con polímeros hidrofílicos para evitar la exposición de bolsillos hidrofóbicos enzimáticos internos durante su exposición al medio. Para eso, elegimos la mejor técnica obtenida con el recubrimiento del derivado Ag-G BIO con polímeros (BIO 10 MC). Las regiones de la superficie de la enzima más ricas en residuos Asp+Glu interaccionan con polímeros policationicos (polietilenimina 10.000Da) y las regiones de la superficie más ricas en grupos amino (Lys + amino terminal) se modifican con dextrano-aldehído. Una tercera capa de polímero (PEG-NH₂) es ofrecida al derivado. Después del recubrimiento con dextrano permanecen en la superficie del derivado, grupos aldehídos, que no reaccionaran con la primera capa, pero sí con el exceso de PEG-NH₂ ofrecido, generando una tercera capa (BIO MC) (Moreno-Pérez, Orrego et al. 2016), proporcionando así una protección de tres capas alrededor del derivado. De este

modo prácticamente toda la superficie de la enzima queda recubierta por polímeros hidrofílicos formada por esta multicapa (MC).

El Cel BIO mostró una mejora considerable en la estabilidad después de la modificación con la MC (figura 39).

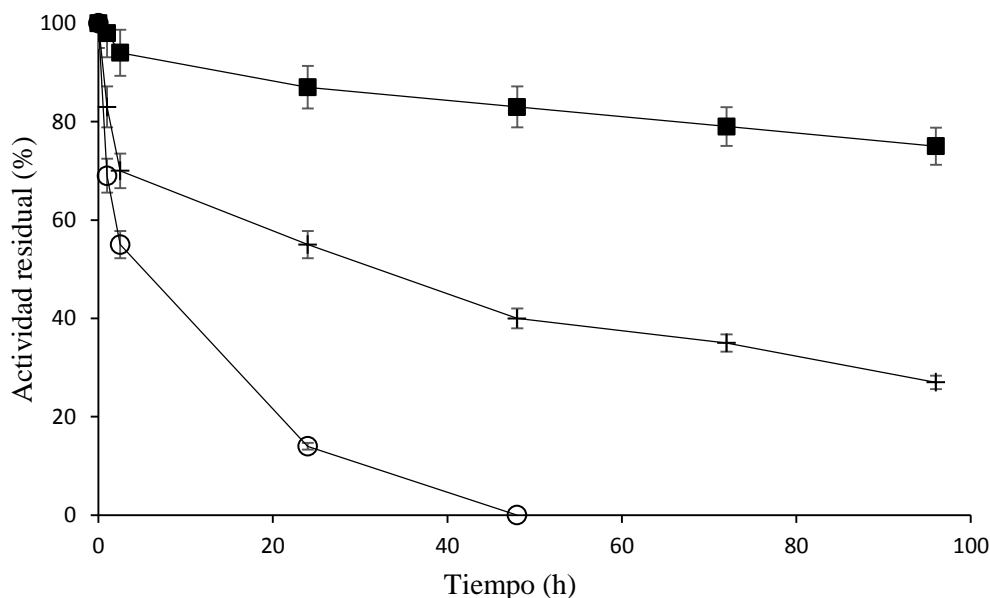


Figura 39 - Efecto de multicapa sobre la estabilidad del derivado Cel BIO MC en comparación con el derivado Cel BIO. Los derivados fueron 1:10 (p / v) suspendidos en tampón fosfato de sodio 0,025 M pH 7,0 y se incubaron a 60 °C. Símbolos: BIO soluble (○), Cel BIO (+) y Cel BIO MC (■).

La inactivación térmica del derivado Cel BIO modificado con la MC (Cel BIO MC) en comparación con el no modificados (Cel BIO) se ensayó a 60 °C pH 7. El derivado Cel BIO conservó el 55% después de 24 h de incubación, mientras que en las mismas condiciones el BIO soluble retenía un 14% de actividad residual. Cel BIO MC después de 24 h de incubación, a 60 °C pH 7, mantuvo un 87% de actividad residual. Después de 96 horas de incubación, Cel BIO MC aún conservó un 75% de actividad.

En comparación entre los biocatalizadores de BIO inmovilizados en soporte agarosa y celulosa (Ag-G BIO y Cel BIO) y con los modificados (BIO 10 MC y Cel BIO MC), en las mismas condiciones (60 ° C pH 7), el soporte agarosa ofreció una mayor estabilidad de la enzima bioxilanasas (figura 40).

El derivado Cel BIO tuvo una vida media de 24 h en las condiciones descritas de incubación, 60° C y pH 7, mientras que la vida media del derivado Ag-G BIO en las mismas condiciones fue de 48 h. En relación a los derivados modificados, después de 96 horas de incubación a 60° C pH 7, Cel BIO MC mostró un 75% de actividad residual, mientras que, bajo las mismas condiciones, el derivado BIO 10 MC retenía aún un 83% de actividad residual.

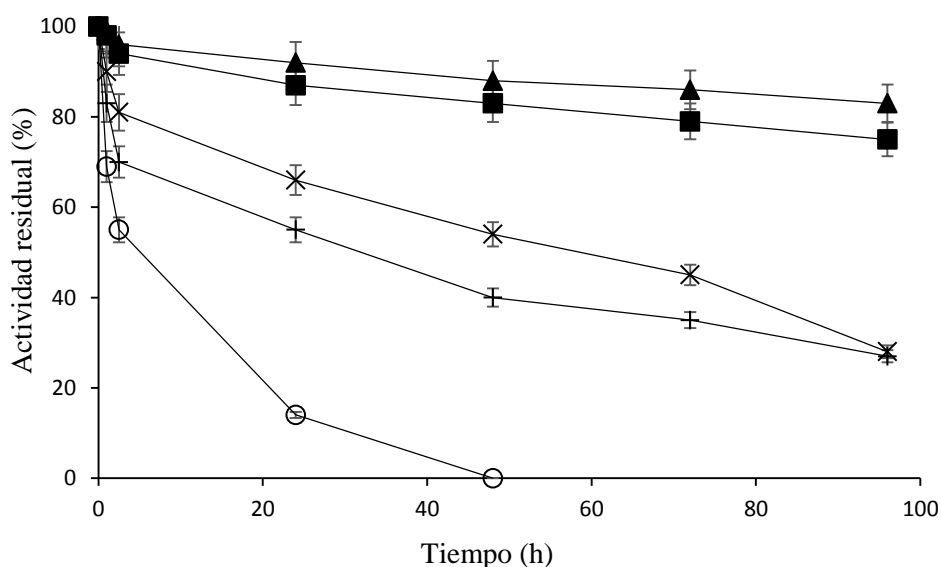


Figura 40 - Efecto de la estabilidad sobre los derivados Cel BIO y Cel BIO MC en comparación con los derivados Ag-G BIO y BIO 10 MC. Los derivados fueron 1:10 (p / v) suspendidos en tampón fosfato de sodio 0,025 M pH 7,0 y se incubaron a 60 °C. Símbolos: Bioxilanasas solubles (○); Ag-G BIO (×); BIO 10 MC (▲); Cel BIO (+) y Cel BIO MC (■).

Los derivados en soporte agarosa obtiene una mejor estabilidad frente a los derivados en soporte celulosa. No hay mucha diferencia de carga entre los

dos derivados, pero una posible explicación es la carga y actividad expresada de los biocatalizadores: el derivado de agarosa posee 7,83 mg proteína/g soporte y una actividad específica de 90 U/mg, mientras el soporte de celulosa posee un 7,65 mg proteína/g soporte y un 85 U/mg de actividad específica.

Si comparamos la estabilización del Cel BIO MC respecto al derivado sin modificar, el recubrimiento de los polímeros en el soporte celulosa ha logrado el mismo rendimiento que el conseguido por el derivado de agarosa, BIO 10 MC frente al derivado Ag-G BIO. Es decir, Cel BIO MC fue 48 veces más estable que Cel BIO, la misma mejora logrado por el BIO 10 MC en relación al biocatalizador Ag-G BIO.

5.4.3 Análisis de la reacción química del xilano utilizando Cel BIO y Cel BIO MC como biocatalizador.

Se realizó la hidrólisis de xilano de acuerdo con las condiciones realizadas con los mejores derivados de la enzima comercial bioxilanasas inmovilizada y modificada en soporte agarosa (BIO 10 MC).

La Figura 41 muestra los resultados de la cinética de hidrólisis de xilano de madera de haya. El biocatalizador Cel BIO MC logró el 55% de la liberación de azúcares reductores en sólo 30 min de reacción, alcanzando una hidrólisis del 100% después de 2 horas. BIO 10 MC hidrolizo el sustrato menos eficientemente, obteniéndose hidrólisis al 100% después de 3 h de reacción.

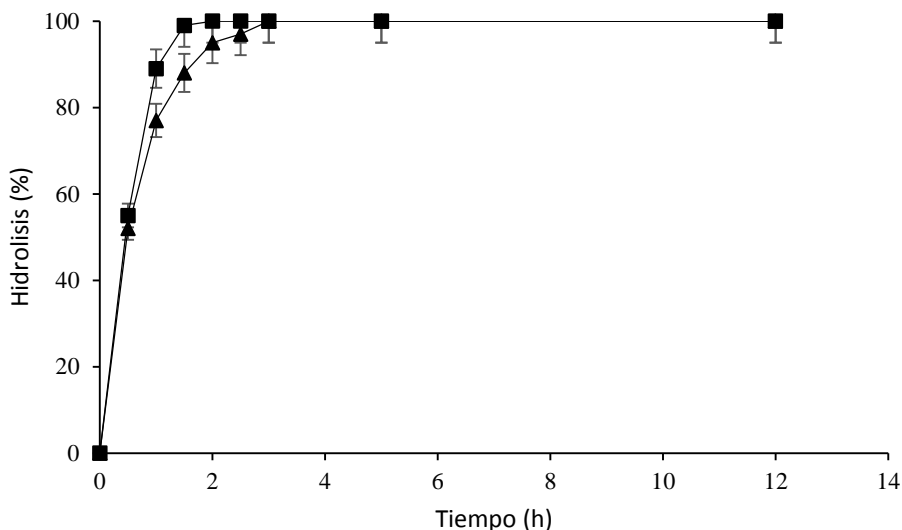


Figura 41 - Cinética de hidrólisis de xilano mediante los biocatalizadores BIO 10 MC y Cel BIO MC. La hidrólisis de xilano de madera de haya solubilizada al 4% (p / v) se realizó a pH 5, 50 ° C, 150 rpm, usando 0,1 g de cada biocatalizador. Símbolos: BIO 10 MC (▲) y Cel BIO MC (■).

5.4.4 Reutilización de los biocatalizadores: Ciclo de reacciones con xilano de haya.

Para probar la estabilidad de los biocatalizadores, ciclos de reacciones fueron probados.

Con respecto al tiempo de reacción utilizado por los biocatalizadores para lograr la hidrólisis del xilano (3 horas BIO 10 MC y 2 horas Cel BIO MC), previamente determinadas (figura 41), durante 10 ciclos de reacción (pasos secuenciales de hidrólisis-lavado-hidrólisis) (Figura 42), los biocatalizadores fueron testados. BIO 10 MC logro ser el mejor biocatalizador debido a su capacidad de reutilización, aunque tardara una hora más que Cel BIO MC para completar la reacción. BIO 10 MC mostró más del 90% de la liberación máxima de azúcares reductores en los 10 ciclos probados, mientras que Cel BIO MC empezó a bajar el rendimiento después de 5 ciclos con rendimiento inferior al 90%.

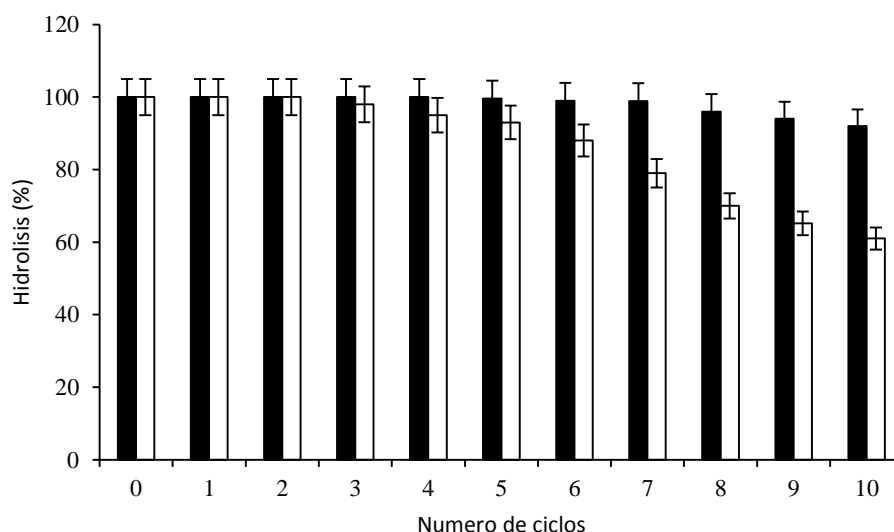


Figura 42 - Estabilidad de biocatalizadores BIO 10 MC y Cel BIO MC durante ciclos operativos de hidrólisis de xilano. Cada ciclo se realizó con xilano de madera de haya solubilizado al 4% (p / v) a pH 5,0 ya 50 °C, 150 rpm, utilizando 0,1 g (0,9 mg prot / g de soporte) de cada biocatalizador. Símbolos: BIO 10 MC (■) y Cel BIO MC (□). La actividad antes del primer ciclo fue considerada como 100%.

Una de las explicaciones por lo que la enzima Bioxilanasas inmovilizada en soporte celulosa, igualmente modificada con la MC, no fue tan eficiente en su capacidad de reuso del biocatalizador en reacciones de hidrólisis puede ser porque las reacciones fueron realizadas en batch, cuando en principio, la celulosa es un soporte indicado para trabajar en reacciones de flujo continuo. Quizá por esto vemos esa diferencia cuando comparamos con el soporte agarosa.

Mismo con estas diferencias entre los soportes, se puede decir que los resultados obtenidos son muy relevantes, pues logramos cumplir el objetivo de producir un biocatalizador altamente cargado capaz de realizar un hidrólisis produciendo XOS y tener la capacidad de reuso.

5.4.5 Análisis de los XOS producidos en la reacción.

La hidrólisis de xilano demostró la eficiencia del proceso para la enzima. El derivado Cel BIO MC logró 3 ciclos que retenían 100% de producción de azúcares reductores y otros 2 más con más de 90%, produciendo alrededor del 91% de xilobiosa en 2 h de reacción. El derivado BIO 10 MC consiguió 10 ciclos reteniendo más del 90% producción de azúcares reductores y produciendo alrededor del 85% de xilobiosa en 3 h de reacción (tabla 7).

Tabla 7 - Composición de la mezcla de XOS obtenida de hidrólisis de xilano de madera de haya utilizando biocatalizadores Cel BIO y Cel 10 MC.

Biocatalizadores	Tiempo de reacción (h)	Xilooligosacáridos (%)		
		Xilose	Xilobiose	Xilotriose
Cel BIO MC	2	4	91	5
BIO 10 MC	3	7	85	8

A pesar de su poca capacidad de reuso, el biocatalizador Cel BIO MC fue capaz de hidrolizar 100% del xilano de haya y producir xilobiosa con un bajo porcentaje de xilosa. Hemos logrado producir un biocatalizador de bajo costo capaz de ser utilizado en la industria en continuo.

5.4.6 Conclusión.

La enzima bioxilanasas se inmovilizó con éxito por unión covalente multipuntual sobre el soporte celulosa altamente activada con grupos aldehído. La inmovilización fue del 85% y el biocatalizador inmovilizado presentó un

85% de actividad xilanasa después de 48 h de incubación en condiciones alcalinas. Además, los derivados mostraron una alta estabilidad térmica. A pH 7,0 y 60° C, la Bioxilanasas inmovilizada en soporte glioxil-celulosa mostró una estabilidad superior, siendo 9 veces más estable que la enzima soluble.

Los resultados mostraron aún una mejora significativa cuando se completó la modificación físico-química del derivado con múltiples capas de polímeros. Cel BIO MC mejoró la estabilidad de la enzima 48 veces en relación con Cel BIO y 120 veces en relación con la enzima soluble. Al comparar los dos derivados inmovilizados y modificados, se observó que BIO 10 MC fue 2 veces más estable que Cel BIO MC, lo que confirma que el derivado con una densa multicapa de polímeros viscosos, producida con PEI 10000, dextrano 6000 y PEG 2000, sobre la superficie de la enzima inmovilizada fue más eficaz en la protección contra los agentes desnaturizantes del medio sobre la enzima Bioxilanasas.

El biocatalizador Cel BIO MC demostró una mayor eficiencia en el tiempo de reacción de hidrólisis de xilano de madera de haya, sin embargo, el biocatalizador BIO 10 MC fue más eficiente en su capacidad de reuso. De acuerdo con el análisis de XOS por HPLC, la composición del producto después de 3 h de hidrólisis de xilano consistió principalmente en xilobiosa (85%) con el biocatalizador BIO 10 MC con más de 90% de conversión en los 10 ciclos de reacción experimentados, mientras Cel BIO MC requiere 2 h para producir 87% xilobiosa, 1 hora más rápido que con el biocatalizador de agarosa, pero solo fue posible el reuso en 5 ciclos de reacción con una conversión superior al 90%.

6 CONCLUSIONES.

A modo de resumen de la presente tesis doctoral, quisiera resaltar una serie de conclusiones finales:

1.- Se utilizaron 2 cócteles comerciales de endoxilanasas de *Trichoderma reesei*: el cóctel BIO y el cóctel D333MDP. El cóctel BIO contiene un mayor número de glicosil hidrolasas, pe, las endoxilanasas xyn3 y xyn4.

2.- Los dos cocteles enzimáticos se estabilizaron por inmovilización covalente multipuntual a soportes glioxil agarosa (Ag-G BIO y Ag-G D3). En ambos casos los derivados conservaron el 90% de actividad catalítica correspondiente a la enzima soluble utilizada para su preparación. Los dos mejores derivados eran aproximadamente 50 veces más estables que las correspondientes enzimas solubles en experimentos de inactivación térmica a pH 5,5 y a 50 °C.

3.- Utilizamos como soporte de inmovilización celulosa macro-porosa, más rígidos y mucho más baratos que los geles de agarosa. La activación de la celulosa se hizo en condiciones muy suaves para evitar la oxidación no deseada del soporte con peryodato. El cóctel BIO se estabilizó también por unión covalente multipuntual a soportes glioxil-celulosa macro-porosa. Los rendimientos de Inmovilización (90%) y la estabilización térmica (50 veces) eran muy similares a los obtenidas con soportes glioxil agarosa.

4.- Los derivados Ag-G BIO se estabilizaron posteriormente por recubrimiento de la superficie de la enzima inmovilizada con polietilenimina, dextrano aldehído y polietilenglicol amino. Los mejores derivados conservaban más del 80 % de la actividad catalítica y eran 350 veces más estables que la enzima soluble en experimentos de inactivación térmica.

5.- Los mejores derivados se estudió la producción de xilo-oligosacaridos por hidrólisis enzimática de xilano de haya. La reacción se llevó a cabo a pH 5,5 y 50 °C. Cuando se alcanzaba más del 99% de liberación a activa liberación de azúcares reductores se obtenía una mezcla de reacción muy interesante: un 90 % de xilobiosa (X2), un 5% de xilo-triosa (X3) 7 solamente un 5% de xilosa (X). X2 y X3 tienen unas excelentes propiedades prebióticas y la xilosa no tiene actividad prebiótica, pero es inocua. Los derivados se reutilizaron y, después de 4 ciclos de reacción de 24 horas, conservaban más de 90% de actividad catalítica.

6.- La hidrólisis de xilano de maíz fue unas 3 veces más lenta que la hidrólisis de xilano de haya, pero se obtenía una mezcla de reacción final muy similar. Estos resultados podrían ser debidos a una mayor ramificación del xilano de maíz y por ello se hidroliza más lentamente que el xilano de haya.

7 REFERENCIAS.

Aachary, A. A. and S. G. Prapulla (2011). "Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **10**(1): 2-16.

Alcalde, M., et al. (1998). "Effect of Chemical Modification of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* sp. on Its Activity and Product Selectivity." Annals of the New York Academy of Sciences **864**(1): 183-187.

Alexandrino, A. M., et al. (2007). "Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr)." Ciência e Tecnologia de Alimentos **27**(2).

Alonso, R., et al. (2015). "Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis." International journal of biological sciences **11**(5): 546.

Andersson, M. M. and R. Hatti-Kaul (1999). "Protein stabilising effect of polyethyleneimine." Journal of biotechnology **72**(1): 21-31.

Aragon, C. C., et al. (2013). "Production of xylo-oligosaccharides by immobilized-stabilized derivatives of endo-xylanase from *Streptomyces halstedii*." Process Biochemistry **48**(3): 478-483.

Arantes, V. and J. N. Saddler (2010). "Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis." Biotechnology for biofuels **3**(1): 4.

Bahulekar, R., et al. (1991). "Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts." Enzyme and Microbial Technology **13**(11): 858-868.

Bai, Y., et al. (2006). "Surface modification for enhancing antibody binding on polymer-based microfluidic device for enzyme-linked immunosorbent assay." Langmuir **22**(22): 9458-9467.

Bastawde, K. (1992). "Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action." World Journal of Microbiology and Biotechnology **8**(4): 353-368.

Bayer, E. A. and R. Lamed (1992). "The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource?" Biodegradation **3**(2): 171-188.

Beg, Q., et al. (2001). "Microbial xylanases and their industrial applications: a review." Applied microbiology and biotechnology **56**(3-4): 326-338.

Betancor, L., et al. (2005). "Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles." Journal of molecular catalysis B: enzymatic **32**(3): 97-101.

Biely, P. (1985). "Microbial xylanolytic systems." Trends in biotechnology **3**(11): 286-290.

Biely, P., et al. (1985). "Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems." FEBS letters **186**(1): 80-84.

Biely, P. and M. Tenkanen (1998). "Enzymology of hemicellulose degradation." Trichoderma and Gliocladium **2**: 25-47.

Blanco, R. M., et al. (1989). "Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment." Enzyme and Microbial Technology **11**(6): 353-359.

Blanco, R. M. and J. Guisán (1989). "Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives." Enzyme and Microbial Technology **11**(6): 360-366.

Bocchini, D., et al. (2005). "Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation." Process Biochemistry **40**(12): 3653-3659.

Bokhari, S., et al. (2010). "Novel thermodynamics of xylanase formation by a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Thermomyces lanuginosus* and its xylanase potential for biobleachability." Bioresource technology **101**(8): 2800-2808.

Bolivar, J. M., et al. (2012). "Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques." Process Biochemistry **47**(5): 679-686.

Bolivar, J. M., et al. (2006). "Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports." Biomacromolecules **7**(3): 669-673.

Bolivar, J. M., et al. (2006). "Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose." Journal of biotechnology **125**(1): 85-94.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry **72**(1-2): 248-254.

Brena, B. M. and F. Batista-Viera (2006). "Immobilization of enzymes: a literature survey." Immobilization of Enzymes and Cells: 15-30.

Brodel, B., et al. (1990). "Regulation and optimization of xylanase production in *Clostridium thermolacticum*." Biotechnology letters **12**(1): 65-70.

Buchholz, K. and J. Klein (1987). "[1] Characterization of immobilized biocatalysts." Methods in Enzymology **135**: 3-30.

Butt, M. S., et al. (2008). "Xylanases and their applications in baking industry." Food Technology and Biotechnology **46**(1): 22-31.

Cai, H., et al. (2011). "A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1." Process Biochemistry **46**(12): 2341-2346.

Campbell, J. M., et al. (1997). "Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats." The Journal of nutrition **127**(1): 130-136.

Cardoso, O. A. V. (2003). "Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*." FEMS microbiology letters **223**(2): 309-314.

Carmona, E. C., et al. (1998). "Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*." FEMS microbiology letters **166**(2): 311-315.

Carmona, E. C., et al. (2005). "Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*." Process Biochemistry **40**(1): 359-364.

Carvalho, F., et al. (2004). "Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain." Bioresource technology **91**(1): 93-100.

Collins, T., et al. (2005). "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases." FEMS microbiology reviews **29**(1): 3-23.

Corzo, N., et al. (2015). "Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos." Nutrición Hospitalaria **31**(1).

Cowan, D. A. and R. Fernandez-Lafuente (2011). "Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization." Enzyme and Microbial Technology **49**(4): 326-346.

Cummings, J. H., et al. (2001). "Prebiotic digestion and fermentation." The American journal of clinical nutrition **73**(2): 415s-420s.

Chapla, D., et al. (2010). "Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification." Biochemical Engineering Journal **49**(3): 361-369.

Davis, B. G. (2003). "Chemical modification of biocatalysts." Current opinion in Biotechnology **14**(4): 379-386.

de Almeida, E. M., et al. (1995). "Purification and biochemical characterization of β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*." FEMS microbiology letters **130**(2-3): 171-175.

DE MAÍZ, O. (2012). "Uso del olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas." Ene **4**(7): 1.

de Sousa, V. M. C., et al. (2011). "The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice." Food and Nutrition Sciences **2**(02): 133.

Dekker, R. F. and G. N. Richards (1975). "Purification, properties, and mode of action of hemicellulase I produced by *Ceratocystis paradoxa*." Carbohydrate research **39**(1): 97-114.

Díaz-Rodríguez, A. and B. G. Davis (2011). "Chemical modification in the creation of novel biocatalysts." Current opinion in chemical biology **15**(2): 211-219.

Ebringerova, A. and T. Heinze (2000). "Xylan and xylan derivatives– biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties." Macromolecular rapid communications **21**(9): 542-556.

Eijsink, V. G., et al. (2005). "Directed evolution of enzyme stability." Biomolecular engineering **22**(1): 21-30.

Eneyskaya, E. V., et al. (2007). "Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family β -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100." Archives of biochemistry and biophysics **457**(2): 225-234.

Fágáin, C. Ó. (1995). "Understanding and increasing protein stability." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology **1252**(1): 1-14.

Fang, T. J., et al. (2010). "Enhanced production of xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural waste using statistical approach." New Biotechnology **27**(1): 25-32.

Fengel, D. and G. Wegener (1983). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions, Walter de Gruyter.

Fernandez-Lafuente, R., et al. (1999). "Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid-phase chemistry of immobilized derivatives: dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents." Enzyme and Microbial Technology **24**(1): 96-103.

Fernandez-Lafuente, R., et al. (1995). "Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents." Enzyme and Microbial Technology **17**(6): 517-523.

Fernandez-Lafuente, R., et al. (1993). "Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method." Enzyme and Microbial Technology **15**(7): 546-550.

Fernandez-Lorente, G., et al. (2015). "Immobilization of proteins on highly activated glyoxyl supports: Dramatic increase of the enzyme stability via multipoint immobilization on pre-existing carriers." Current Organic Chemistry **19**(17): 1719-1731.

Ferreira-Filho, E. (1994). "The xylan-degrading enzyme system." Brazilian journal of medical and biological research **27**(5): 1093-1109.

Garrote, G., et al. (2004). "Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials." Trends in Food Science & Technology **15**(3): 191-200.

Gavrilescu, M. and Y. Chisti (2005). "Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry." Biotechnology advances **23**(7): 471-499.

Gawande, P. and M. Kamat (1998). "Preparation, characterization and application of *Aspergillus* sp. xylanase immobilized on Eudragit S-100." Journal of biotechnology **66**(2): 165-175.

Gianfreda, L. and M. R. Scarfi (1991). "Enzyme stabilization: state of the art." Molecular and cellular biochemistry **100**(2): 97-128.

Gibson, G. R., et al. (2004). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics." Nutrition research reviews **17**(02): 259-275.

Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." The Journal of nutrition **125**(6): 1401.

Gomes, J. and W. Steiner (2004). "The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes." Food Technology and Biotechnology **42**(4): 223-235.

Goulart, A. J., et al. (2005). "Partial purification and properties of cellulase-free alkaline xylanase produced by *Rhizopus stolonifer* in solid-state fermentation." Brazilian Archives of Biology and Technology **48**(3): 327-333.

Guimarães, L. H. S., et al. (2006). "Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest." Brazilian Journal of Microbiology **37**(4): 474-480.

Guisán, J. (1988). "Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes." Enzyme and Microbial Technology **10**(6): 375-382.

Guisán, J. M., et al. (1997). "Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose: Strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment." Immobilization of Enzymes and Cells: 277-287.

Guisán, J. M., et al. (1991). "Immobilization-stabilization of α -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels." Biotechnology and bioengineering **38**(10): 1144-1152.

Gupta, M. (1991). "Thermostabilization of proteins." Biotechnology and applied biochemistry **14**(1): 1-11.

Han, M. K., et al. (2010). "Catalytic properties of a GH10 endo- β -1, 4-xylanase from *Streptomyces thermocarboxydus* HY-15 isolated from the gut of *Eisenia fetida*." Journal of molecular catalysis B: enzymatic **62**(1): 32-39.

Harada, K. M., et al. (2008). "Paenibacillus sp. strain HC1 xylanases responsible for degradation of rice bran hemicellulose." Microbiological research **163**(3): 293-298.

Hoare, D. t. and D. Koshland (1967). "A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins." Journal of Biological Chemistry **242**(10): 2447-2453.

Hüttermann, A., et al. (2001). "Modification of lignin for the production of new compounded materials." Applied microbiology and biotechnology **55**(4): 387-394.

Iyer, P. V. and L. Ananthanarayan (2008). "Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment." Process Biochemistry **43**(10): 1019-1032.

Ji, X.-J., et al. (2011). Fuels and chemicals from hemicellulose sugars. Biotechnology in China III: biofuels and bioenergy, Springer: 199-224.

Jiang, Z., et al. (2010). "Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread." Food Chemistry **120**(2): 457-462.

Joint, F. (2002). "WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food." London, Ontario, Canada **30**.

KANDA, T., et al. (1985). "Purification and properties of two endo-1, 4- β -xylanases from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*).[" The Journal of Biochemistry](#) **98**(6): 1545-1554.

Katchalski-Katzir, E. and D. M. Kraemer (2000). "Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential." [Journal of molecular catalysis B: enzymatic](#) **10**(1): 157-176.

Keskar, S. S. (1992). "High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T 7: Cultural conditions and enzyme properties." [Biotechnology letters](#) **14**(6): 481-486.

Klibanov, A. M. (1983). "Stabilization of enzymes against thermal inactivation."[Advances in applied microbiology](#) **29**: 1-28.

Ko, C.-H., et al. (2010). "Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching." [International Biodeterioration & Biodegradation](#) **64**(1): 13-19.

Kosugi, A., et al. (2002). "Xylanase and acetyl xylan esterase activities of XynA, a key subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome for xylan degradation." [Applied and environmental microbiology](#) **68**(12): 6399-6402.

Kovács, K., et al. (2009). "Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*." [Bioresource technology](#) **100**(3): 1350-1357.

Kulkarni, N., et al. (1999). "Molecular and biotechnological aspects of xylanases."[FEMS microbiology reviews](#) **23**(4): 411-456.

Lafond, M., et al. (2011). "GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production." [Microbial cell factories](#) **10**(1): 1.

Lakshmi, G. S., et al. (2009). "Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization." [Biochemical Engineering Journal](#) **48**(1): 51-57.

Leckband, D. and R. Langer (1991). "An approach for the stable immobilization of proteins." [Biotechnology and bioengineering](#) **37**(3): 227-237.

Lenders, J. P. and R. Crichton (1984). "Thermal stabilization of amylolytic enzymes by covalent coupling to soluble polysaccharides." Biotechnology and bioengineering **26**(11): 1343-1351.

Levy, D. and J. Eveleigh (1978). "Reversed immunosorbents: a simple method for specific antibody immobilization." Journal of immunological methods **22**(1-2): 131-142.

Liszka, M. J., et al. (2012). "Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions." Annual review of chemical and biomolecular engineering **3**: 77-102.

López-Gallego, F., et al. (2005). "Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports." Journal of biotechnology **116**(1): 1-10.

Lundblad, R. L. (2014). Chemical reagents for protein modification, CRC press.

Lynd, L. R., et al. (2002). "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology." Microbiology and molecular biology reviews **66**(3): 506-577.

Mandalari, G., et al. (2008). "Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products." Bioresource technology **99**(11): 5130-5133.

Manrich, A., et al. (2010). "Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment on agarose and on chitosan supports." Applied biochemistry and biotechnology **161**(1-8): 455-467.

Mateo, C., et al. (2005). "Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins." Enzyme and Microbial Technology **37**(4): 456-462.

Mateo, C., et al. (2007). "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." Enzyme and Microbial Technology **40**(6): 1451-1463.

Matsuzawa, T., et al. (2016). "Improvement of thermostability and activity of *Trichoderma reesei* endo-xylanase Xyn III on insoluble substrates." Applied microbiology and biotechnology: 1-9.

- Medeiros, R. G., et al. (2003). "Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species." International Biodeterioration & Biodegradation **52**(2): 97-100.
- Milagres, A., et al. (2005). "Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*." FEMS microbiology letters **253**(2): 267-272.
- Milagres, A., et al. (2004). "Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor." Process Biochemistry **39**(11): 1387-1391.
- Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Analytical chemistry **31**(3): 426-428.
- Mishra, C., et al. (1985). "Production of xylanolytic enzymes in association with the cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*." Enzyme and Microbial Technology **7**(6): 295-299.
- Miyazaki, K., et al. (2000). "Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme." Journal of molecular biology **297**(4): 1015-1026.
- Mohamad, N. R., et al. (2015). "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes." Biotechnology & Biotechnological Equipment **29**(2): 205-220.
- Monti, R., et al. (1991). "Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*." Canadian journal of microbiology **37**(9): 675-681.
- Moreno-Pérez, S., et al. (2016). "Chapter Three-Intense PEGylation of Enzyme Surfaces: Relevant Stabilizing Effects." Methods in Enzymology **571**: 55-72.
- Moreno, M.-L., et al. (2014). "Disulfide stress: a novel type of oxidative stress in acute pancreatitis." Free Radical Biology and Medicine **70**: 265-277.
- Moreno Pérez, S. (2015). "Ingeniería de la síntesis de triglicéridos de ácidos omega-3 y de antioxidantes protectores catalizados por lipasas."
- Mumtaz, S., et al. (2008). "Xylooligosaccharide enriched yoghurt: physicochemical and sensory evaluation." Pakistan Journal of Nutrition **7**(4): 566-569.

Nabarlatz, D., et al. (2007). "Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides." Carbohydrate Polymers **69**(1): 20-28.

Neuhoff, V., et al. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-262.

Ó'Fágáin, C. (2003). "Enzyme stabilization—recent experimental progress." Enzyme and Microbial Technology **33**(2): 137-149.

Palomo, J. M., et al. (2007). "Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst." Enzyme and Microbial Technology **40**(4): 704-707.

Parajó, J., et al. (2004). "Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials." Trends in Food Science & Technology **15**(3): 115-120.

Pastor, F. J., et al. (2007). "Xylanases: molecular properties and applications." Industrial enzymes **67**: 65-82.

Pedroche, J., et al. (2007). "Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: correlation between enzyme–support linkages and thermal stability." Enzyme and Microbial Technology **40**(5): 1160-1166.

Pessoa Jr, A., et al. (1997). "Evaluation of sugar cane hemicellulose hydrolyzate for cultivation of yeasts and filamentous fungi." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **18**(6): 360-363.

Polizeli, M., et al. (2005). "Xylanases from fungi: properties and industrial applications." Applied microbiology and biotechnology **67**(5): 577-591.

Prade, R. A. (1996). "Xylanases: from biology to biotechnology." Biotechnology and Genetic Engineering Reviews **13**(1): 101-132.

Puls, J. (1997). Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. Macromolecular Symposia, Wiley Online Library.

Purkharthofer, H., et al. (1993). "Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture." Enzyme and Microbial Technology **15**(8): 677-682.

Qiu, Z., et al. (2010). "A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry." Enzyme and Microbial Technology **46**(6): 506-512.

Ragagnin de Menezes, C. and L. R. Durrant (2008). "Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana." Ciência Rural **38**(2).

Rantanen, H., et al. (2007). "Preparation of arabinoxylobiose from rye xylan using family 10 *Aspergillus aculeatus* endo-1, 4- β -D-xylanase." Carbohydrate Polymers **68**(2): 350-359.

Rezende, M. I., et al. (2002). "Xylanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse." Brazilian Journal of Microbiology **33**(1): 67-72.

Rocha-Martín, J., et al. (2012). "Characterization and further stabilization of a new anti-prelog specific alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 for asymmetric reduction of carbonyl compounds." Bioresource technology **103**(1): 343-350.

Rodrigues, R. C., et al. (2014). "Amination of enzymes to improve biocatalyst performance: coupling genetic modification and physicochemical tools." RSC Advances **4**(72): 38350-38374.

Rodrigues, R. C., et al. (2011). "Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes." Advanced Synthesis & Catalysis **353**(13): 2216-2238.

Rodrigues, R. C., et al. (2009). "Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: critical role of chemical amination." Process Biochemistry **44**(9): 963-968.

Sánchez, C. (2009). "Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi." Biotechnology advances **27**(2): 185-194.

Sandgren, M., et al. (2005). "Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes." Progress in biophysics and molecular biology **89**(3): 246-291.

Sandrim, V., et al. (2005). "Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching." Process Biochemistry **40**(5): 1823-1828.

Sardar, M., et al. (2000). "Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit TM L-100." Enzyme and Microbial Technology **27**(9): 672-679.

Seijás, J. M. G. (2012). "PURIFICACIÓN E INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS INDUSTRIALES." Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Shah, S. and M. N. Gupta (2008). "Simultaneous refolding, purification and immobilization of xylanase with multi-walled carbon nanotubes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics **1784**(2): 363-367.

Shallom, D. and Y. Shoham (2003). "Microbial hemicellulases." Current opinion in microbiology **6**(3): 219-228.

Sharma, M., et al. (2010). "Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Malbranchea flava* active under alkaline conditions." Bioresource technology **101**(22): 8834-8842.

Shevchenko, A., et al. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels." Analytical chemistry **68**(5): 850-858.

Silva, E., et al. (2005). "Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains." Process Biochemistry **40**(1): 161-164.

Sjöström, E. (1993). "Wood polysaccharides." Wood chemistry, fundamentals and applications: 51-70.

Soerensen, H. R., et al. (2011). Hydrolysis of arabinoxylan, Google Patents.

Srere, P. A. and K. Uyeda (1976). "[2] Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices." Methods in Enzymology **44**: 11-19.

Subramaniyan, S. and P. Prema (2002). "Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application." Critical reviews in Biotechnology **22**(1): 33-64.

Sun, Y. and J. Cheng (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." Bioresource technology **83**(1): 1-11.

Tateyama, I., et al. (2005). "Effect of xylooligosaccharide intake on severe constipation in pregnant women." Journal of nutritional science and vitaminology **51**(6): 445-448.

Tavares, V. B., et al. (1997). "Characterization of a cellulase-free xylanase producing *Bacillus* sp for biobleaching of kraft pulp." Revista de Microbiologia: 179-182.

Teng, C., et al. (2010). "Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase." Bioresource technology **101**(19): 7679-7682.

Tenkanen, M., et al. (2013). "Xylanase XYN IV from *Trichoderma reesei* showing exo- and endo-xylanase activity." FEBS Journal **280**(1): 285-301.

Thompson, N. S. (1991). "Hemicellulose." Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.

Timell, T. E. (1967). "Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses." Wood Science and Technology **1**(1): 45-70.

Tischer, W. and V. Kasche (1999). "Immobilized enzymes: crystals or carriers?" Trends in biotechnology **17**(8): 326-335.

Torres, R., et al. (2002). "Reversible immobilization of invertase on Sepabeads coated with polyethyleneimine: Optimization of the biocatalyst's stability." Biotechnology Progress **18**(6): 1221-1226.

Torres, R., et al. (2004). "Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sepabeads coated with polyethyleneimine." Biotechnology Progress **20**(4): 1297-1300.

Törrönen, A., et al. (1992). "The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes." Nature Biotechnology **10**(11): 1461-1465.

Tuohy, K., et al. (2005). "Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy." Current pharmaceutical design **11**(1): 75-90.

Van Craeyveld, V., et al. (2008). "Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats." The Journal of nutrition **138**(12): 2348-2355.

van den Brink, J. and R. P. de Vries (2011). "Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation." Applied microbiology and biotechnology **91**(6): 1477.

Van Loo, J., et al. (1999). "Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095)." British Journal of Nutrition **81**(2): 121-132.

Vardakou, M., et al. (2004). "Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan." Innovative Food Science & Emerging Technologies **5**(1): 107-112.

Vazquez, M., et al. (2000). "Xylooligosaccharides: manufacture and applications." Trends in Food Science & Technology **11**(11): 387-393.

Wakiyama, M., et al. (2008). "Purification and properties of family-10 endo-1, 4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene." Journal of bioscience and bioengineering **105**(4): 367-374.

Wakiyama, M., et al. (2010). "An extracellular endo-1, 4- β -xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene." Journal of bioscience and bioengineering **109**(3): 227-229.

Watanabe, N., et al. (2006). "Structure of an orthorhombic form of xylanase II from *Trichoderma reesei* and analysis of thermal displacement." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography **62**(7): 784-792.

Webb, E. (1992). "International Union of Biochemistry and Molecular Biology." Enzyme nomenclature.

Wong, K. K., et al. (1986). "Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*." Canadian journal of microbiology **32**(7): 570-576.

Xiong, H., et al. (2004). "Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30." Process Biochemistry **39**(6): 731-736.

Yang, R., et al. (2005). "Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides." LWT-Food Science and Technology **38**(6): 677-682.

Yoon, K. Y., et al. (2006). "Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues." LWT-Food Science and Technology **39**(4): 388-392.

Zhang, Y. H. P. and L. R. Lynd (2004). "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems." Biotechnology and bioengineering **88**(7): 797-824.

Fatos e dados sobre a Novozymes. Novozymes – repensando o amanhã. Disponível em: <https://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/news/factsheet/Documents/Factsheet_2017_PTBR.pdf?la=en>. Acesso em: 25 Jul. 2017.

Study uses neutron scattering, supercomputing to demystify forces at play in biofuel production. Disponível em: <<https://phys.org/news/2013-11-neutron-supercomputing-demystify-biofuel-production.html>>. Acesso em: 24 Ago. 2017.

8 ANEXO CON ARTÍCULOS PUBLICADOS



CHAPTER THREE

Intense PEGylation of Enzyme Surfaces: Relevant Stabilizing Effects

S. Moreno-Pérez, A.H. Orrego, M. Romero-Fernández,
L. Trobo-Maseda, S. Martins-DeOliveira, R. Munilla,
G. Fernández-Lorente¹, J.M. Guisan¹

Institute of Catalysis, Spanish Research Council, CSIC, Madrid, Spain

¹Corresponding authors: e-mail address: glorente@icp.csic.es; jmguisan@icp.csic.es

Contents

1. Introduction	56
2. Theory	57
3. Protocols	62
3.1 PEGylation of Chemically Aminated Enzymes	62
3.2 PEGylation of Enzymes Coated with Polymers	65
4. Inactivation of Modified Enzyme Derivatives	68
5. Conclusions	70
Acknowledgments	71
References	71

Abstract

This chapter describes the physicochemical coating of the surface of immobilized enzymes with a dense layer of polyethylene glycol (PEG) to improve enzyme stability. One hypothesis is that a dense, viscous, polar PEG layer around the enzyme would enhance enzyme thermal stability, while still providing access to the active site. PEG groups were attached by using aldehyde-dextran polymers, the dextran polymers are in turn attached to the enzyme surface that have been enriched with excess primary amino groups. The enzymes themselves were initially attached onto porous solids such that they may be separated easily from the reaction mixtures for easy downstream processing and that they may be recycled to reduce the cost of the biocatalyst. The hierarchical modification of enzyme surface with three different sublayers, under chemical design, provided a rational control at several structural levels. Few methods for increasing the number of amino groups on the surface of the enzyme are described: (a) chemical amination of carboxyl residues and (b) coating of the enzyme surface with cationic polymers containing a high percentage of primary amines. Reliable protocols for the PEGylation of four different enzymes are described here. For example, lipases from *Thermomyces lanuginosa*, *Candida antarctica* B, and *Rhizomucor miehei* attached



Immobilization and Stabilization of Beta-Xylosidases from *Penicillium janczewskii*

César Rafael Fanchini Terrasan^{1,2} ·
María Romero-Fernández¹ · Alejandro H. Orrego¹ ·
Sandro Martins Oliveira¹ · Benevides Costa Pessela³ ·
Eleonora Cano Carmona² · José Manuel Guisan¹

Received: 9 September 2016 / Accepted: 10 November 2016 /
Published online: 23 November 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract β -Xylosidases are critical for complete degradation of xylan, the second main constituent of plant cell walls. A minor β -xylosidase (BXYL II) from *Penicillium janczewskii* was purified by ammonium sulfate precipitation (30% saturation) followed by DEAE-Sephadex chromatography in pH 6.5 and elution with KCl. The enzyme presented molecular weight (MW) of 301 kDa estimated by size exclusion chromatography. Optimal activity was observed in pH 3.0 and 70–75 °C, with higher stability in pH 3.0–4.5 and half-lives of 11, 5,

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12010-016-2331-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ César Rafael Fanchini Terrasan
cesarterrasan@hotmail.com; https://www.researchgate.net/profile/Cesar_Rafael_Fanchini_Terrasan

Alejandro H. Orrego
a.herrera@csic.es

Benevides Costa Pessela
b.pessela@csic.es

Eleonora Cano Carmona
ecarmona@rc.unesp.br

José Manuel Guisan
jmguisan@icp.csic.es

¹ Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis (ICP), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Cantoblanco, Calle de Marie Curie, 28049 Madrid, Spain

² Departamento de Bioquímica e Microbiología, Instituto de Biociências, Univ Estadual Paulista (UNESP), Caixa Postal 199, Av. 24 A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

³ Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de los Alimentos (CIAL), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

RESEARCH ARTICLE



Immobilization and stabilization of commercial β -1,4-endoxylanase DepolTM 333MDP by multipoint covalent attachment for xylan hydrolysis: Production of prebiotics (xylo-oligosaccharides)

Sandro Martins de Oliveira^a, Sonia Moreno-Perez^b, María Romero-Fernández^a, Gloria Fernandez-Lorente^{a,c}, Javier Rocha-Martín^a and Jose M. Guisán^a 

^aDepartment of Biocatalysis, Institute of Catalysis and Petrochemistry (ICP) CSIC, Campus UAM, Madrid, Spain; ^bPharmacy and Biotechnology Department, School of Biomedical Sciences, Universidad Europea, Madrid, Spain; ^cDepartment of Biotechnology and Microbiology (MICRO-BIO), Institute of Food Science Research (CIAL) CSIC – Campus UAM, Madrid, Spain

ABSTRACT

The commercial enzyme DepolTM 333MDP (D333MDP) was immobilized by multipoint covalent attachment onto 10% cross-linked agarose beads support highly activated with aldehyde groups. The enzyme immobilization process was very efficient, retaining 86% of its initial catalytic activity. Thermal stability of the immobilized D333MDP biocatalysts varied according to the incubation time of the enzyme-support. The optimal immobilized biocatalyst was produced after 24 h of incubation under alkaline conditions and longer incubation times resulted in a loss of stability. The optimal immobilized biocatalyst was 60- and 50-fold more stable at pH 5.5 and pH 7 at 50°C than the soluble enzyme, respectively. Activity and stability at pH 5.5 were enhanced when the optimal immobilized biocatalyst was modified by chemical amination of the enzyme surface. The chemical amination of the immobilized enzyme surface was 5-fold more stable at pH 5.5 and 50°C compared with the unmodified immobilized biocatalyst. The best immobilized biocatalysts (containing 100 U/g of support) were evaluated in the beechwood xylan hydrolysis reaction at 50°C and pH 5.5. 80% of the reducing sugars were released after 6 h of hydrolysis with the aminated biocatalyst. Xylan hydrolysis reaction with the aminated biocatalyst was 80% faster than with the non-aminated one. The final composition of the xylooligosaccharides (XOS) obtained was identified and quantified by HPAEC-PAD which showed it was composed of 90% of xylobiose and 5% of xylotriose and xylose. The aminated immobilized-stabilized biocatalyst was used for four cycles of hydrolysis with no loss of catalytic activity, resulting in highly active and stable derivative suitable for industrial processes.

ARTICLE HISTORY

Received 16 January 2017
Revised 16 February 2017
Accepted 21 February 2017

KEYWORDS

Xylan hydrolysis; enzyme immobilization-stabilization; multipoint covalent immobilization; β -1,4-endoxylanase; xylooligosaccharides production

Introduction

Xylan is a heteropolysaccharide, the main component of hemicellulose, with a backbone composed of β -(1-4) linked β -xylopyranose residues substituted in different degrees by side chain residues as glucopyranosyl, 4-O-methyl-D-glucuronopyranosyl, α -L-arabinofuranosyl, acetyl, feruloyl, and *p*-coumaroyl depending on the nature of the lignocellulosic biomass (Bastawde 1992; Vázquez et al. 2000). Xylooligosaccharides (XOS) present a ramified structure and are formed by 2–10 xylose residues linked by β -(1-4) bonds and with substituents, such as uronic acids, arabinose residues and acetyl groups. XOS are naturally present in vegetables, fruits, vegetables, bamboo, honey and milk and can be produced on an industrial scale from xylan material (Carvalho et al. 2013). Therefore, they can become an

important prebiotic ingredient with very low-cost and widespread availability. XOS are advantageous over other non-digestible oligosaccharides with regards to both health and technologically related properties. The methods for the production of XOS commonly include enzymatic hydrolysis, chemical production or a combination of these two approaches. However, the use of enzymatic hydrolysis is considered a promising alternative to chemical production since it presents several advantages, such as easy recovery, a decreased production of undesirable byproducts and production of XOS with high purity (Bian et al. 2013).

In nature, xylanolytic enzyme systems are composed of exo-xylanase, endo-xylanase and/or β -xylosidase and debranching enzymes. For the production of XOS, the production of xylose should be avoided. Thus, enzyme

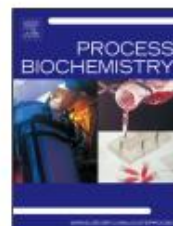
CONTACT José M. Guisán  jmguisan@icp.csic.es; Javier Rocha-Martín  javirocha@icp.csic.es  Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis and Petrochemistry (ICP) CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, Madrid, Spain

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Accepted Manuscript

Title: Covalent immobilization-stabilization of β -1,4-endoxyranases from *Trichoderma reesei*: Production of xylooligosaccharides

Authors: Sandro Martins de Oliveira, Sonia Moreno-Perez, César Rafael Fanchini Terrasan, Maria Romero-Fernández, Marcelo Fernandes Vieira, Jose M. Guisan, Javier Rocha-Martin



PII: S1359-5113(17)31372-7
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.018>
Reference: PRBI 11160

To appear in: *Process Biochemistry*

Received date: 22-8-2017
Revised date: 15-9-2017
Accepted date: 18-9-2017

Please cite this article as: de Oliveira Sandro Martins, Moreno-Perez Sonia, Terrasan César Rafael Fanchini, Romero-Fernández Maria, Vieira Marcelo Fernandes, Guisan Jose M, Rocha-Martin Javier. Covalent immobilization-stabilization of β -1,4-endoxyranases from *Trichoderma reesei*: Production of xylooligosaccharides. *Process Biochemistry* <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.018>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.